

**Die Wirkung von Vitamin D-Metaboliten
und Metabolitkombinationen im prophylaktischen
Fütterungsversuch an rachitischen
Hühnerküken**

Josef B. Mohn

Disbui. München

1987

Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und
Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Arbeit angefertigt unter Leitung von
Priv. Doz. Dr. Dr. habil. W. Rambeck

**Die Wirkung von Vitamin D-Metaboliten
und Metabolitkombinationen im prophylaktischen
Fütterungsversuch an rachitischen
Hühnerküken**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Josef B. Mohn
aus
Vorderreute bei Tettnang
München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Priv.Do. Dr. Dr.habil. W. Rambeck

Korreferent: Priv.Do. Dr. Dr.habil. F. Graf

Tag der Promotion: 24. Juli 1987



drucken + binden
gmbh
Schellingstraße 23
8000 München 40
☎ 089 / 28 44 45

1. Einleitung des Herausgebers 1

2. Literaturverzeichnis 3

3.1. Einleitung des Herausgebers 3

3.2. Beschreibung des ersten Stoffwechsels 10

3.3. Funktion des 2. Stoffwechsels 15

3.4. Bedeutung des 3. Stoffwechsels 18

3.5. Welche Bedeutung hat die Wirkung des 4. Stoff-

wechsels bei der Verdauung des 5. Stoff-

wechsels? 20

Für Sigrid

3.6. Bedeutung des 6. Stoffwechsels 22

3.7. Bedeutung des 7. Stoffwechsels 25

3.8. Bedeutung des 8. Stoffwechsels 28

3.9. Bedeutung des 9. Stoffwechsels 31

3.10. Bedeutung des 10. Stoffwechsels 34

3.11. Bedeutung des 11. Stoffwechsels 37

3.12. Bedeutung des 12. Stoffwechsels 40

3.13. Bedeutung des 13. Stoffwechsels 43

3.14. Bedeutung des 14. Stoffwechsels 46

3.15. Bedeutung des 15. Stoffwechsels 49

3.16. Bedeutung des 16. Stoffwechsels 52

3.17. Bedeutung des 17. Stoffwechsels 55

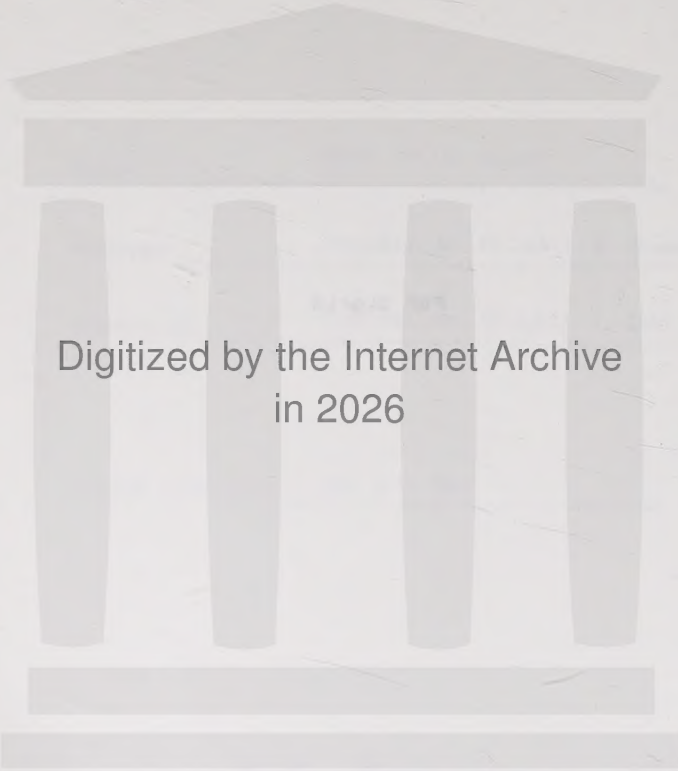
3.18. Bedeutung des 18. Stoffwechsels 58

3.19. Bedeutung des 19. Stoffwechsels 61

3.20. Bedeutung des 20. Stoffwechsels 64

3.21. Bedeutung des 21. Stoffwechsels 67

3.22. Bedeutung des 22. Stoffwechsels 70



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1.	Einleitung und Problemstellung	3
2.	Literaturübersicht	8
2.1.	Vitamin D ₃ -Stoffwechsel	8
2.2.	Regulation des Vitamin D ₃ -Stoffwechsels	12
2.3.	Funktion von 1,25(OH) ₂ D ₃ bei der Regulation der Calciumhomöostase	16
2.4.	Mögliche Beteiligung von Vitamin D Meta- boliten bei der Knochenmineralisation	21
2.5.	Wirkung von Vitamin D ₃ -Metaboliten auf andere Zielorgane.....	23
2.6.	Kombinationseffekte von Vitamin D ₃ -Metabo- liten	24
2.7.	Interaktionen zwischen Vitamin D-Wirkung und anderen Vitaminen	25
3.	Eigene Untersuchungen	27
3.1.	Tiermaterial	27
3.2.	Tierhaltung	28
3.3.	Versuchsdurchführung	28
3.4.	Futterzusammensetzung und -zubereitung	29
3.5.	Probenentnahme und Bestimmungsmethoden	30
4.	Ergebnisse	38
4.1.	Versuch I	38
4.2.	Versuch II	47
4.3.	Versuch III	57
4.4.	Versuch IV	66
4.5.	Versuch V	75

5.	Diskussion	82
6.	Zusammenfassung	90
	Summary	92
7.	Literaturverzeichnis	94

1. Einleitung und Problemstellung

Schon Mitte des 17. Jahrhunderts, als mit dem Zeitalter der Aufklärung auch in der Medizin eine analytische Denkungsweise vorherrschend wurde, beschrieben Whistler, De Boot und Glisson unabhängig voneinander sehr genau die Symptome der Rachitis bei Kleinkindern in den Städten.

Obwohl bereits 1822 der polnische Arzt Sniadecki auf den Wert des Sonnenlichtes bei Aufenthalt im Freien hingewiesen hatte, erreichte die Rachitis eine verhängnisvolle Zunahme während der industriellen Revolution. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts waren an die 90 % der Kinder in den Großstädten an Rachitis erkrankt. Bei Frauen, die in ihrer Kindheit an Rachitis litten und deren Becken demzufolge oftmals verformt war, führte dies zu einer sehr hohen Sterblichkeitsrate für Mutter und Kind bei der Geburt (KOLICK, 1983).

Erst Mellanby erzielte 1918 einen großen Fortschritt, als er Hundewelpen, die an diätetisch erzeugter Rachitis litten, durch Verabreichung von Kabeljauleberöl heilen konnte.

McCOLLUM et al. (1922) konnten zeigen, daß der antirachitische Faktor nicht, wie zuerst vermutet, Vitamin A, sondern ein anderes "Vitamin" war, das sie Vitamin D nannten.

Nachdem Huldschinsky 1919 Rachitis bei Kindern durch Bestrahlung mit einer Quecksilberlampe und Hess und Unger 1921 durch Exposition von Sonnenlicht heilen konnten, war klar, daß auch das Sonnenlicht antirachitische Wirkungen haben mußte (NORMAN, 1984).

Der Durchbruch gelang WINDAUS et al. (1936), mit der Isolierung von Vitamin D aus Kabeljaulebertran, und als sie beweisen konnten, daß dieses Vitamin D identisch war mit dem in der Haut nach Exposition von Sonnenlicht produzierten. Die Arbeitsgruppe um LUND und DeLUCA (1966) erkannte, daß Vitamin D erst metabolisiert werden muß, um biologische Wirksamkeit zu erlangen.

Mittlerweile sind neben dem in der Leber produzierten $25(\text{OH})\text{D}_3$ und den in der Niere hergestellten Metaboliten $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mehr als 30 verschiedene Metaboliten bekannt, von denen einige biologisch aktiv sind, wenn auch weniger wirksam (und damit weniger toxisch) als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Trotz dieser Erkenntnis stellt die Rachitis bei Kindern und die Osteomalazie des Erwachsenen in bestimmten Bevölkerungsgruppen ein zunehmendes Problem dar. Die moderne Lebensweise mit bevorzugtem Aufenthalt in Gebäuden (FLURY und HALDIMANN, 1981), jahreszeitliche Schwankungen des UV-Anteils im Sonnenlicht (LAWSON, 1984) und Verhaltensweisen wie geringe Sonnenlichtexposition während der Wintermonate (FRASER, 1981) führen dazu, daß bei einem Drittel der Gesunden in der Altersgruppe über 65 Jahre ein Vitamin D Mangel zu verzeichnen ist (SCHMIDI-GAYK et al., 1981).

Durch Vitamin D Mangel verursachte Osteomalazie tritt sehr häufig bei asiatischen Einwanderern nach England auf. Hier sind geringe Vitamin D Aufnahme durch die überwiegend vegetarische Ernährung ohne Milch- und Eiprodukte und die reduzierte Calciumverfügbarkeit wegen des hohen Phytatgehalts der Nahrung die Ursache (FRASER, 1981).

Ein besonderes Problem stellt sich bei Farbigen in nördlichen Breiten. So haben Farbige die gleiche Vitamin D Bildungskapazität in der Haut, aber wegen des hohen Melaningehaltes der Haut benötigen sie eine sehr viel höhere Dosis an UV-Licht als Weiße. Dies und der niedrige Gehalt an

Vitamin D in der Muttermilch erklären das häufige Auftreten von Rachitis bei Säuglingen von Farbigen in den Vereinigten Staaten (GREER and TSANG, 1983). Andererseits ist bekannt, daß die postmenopausale Osteoporose bei Schwarzen seltener vorkommt als bei Weißen.

Da Osteoporose vor allem bei Frauen auftritt, ist es sehr bedeutsam, daß in dem Lebensabschnitt, in dem das Skelett die maximale Calciumeinlagerung vollzieht, zwei Drittel aller weiblichen US-Bürger weniger Calcium zu sich nehmen, als dem täglichen Bedarf entspricht. Berücksichtigt man die Tatsache, daß selbst gesunde Frauen in der postmenopausalen Phase mehr als 40 mg Calcium pro Tag verlieren, ergibt sich ein jährlicher Knochenschwund von über 1,5 Prozent. Schätzungsweise 25 % bis 30 % aller postmenopausalen Frauen leiden an schwerwiegenden Problemen durch demineralisierte Knochen (AVIOLI, 1984).

Nach KRUSE (1985) gibt es zwei Indikationsstellungen für die Therapie mit Vitamin D bzw. D-Metaboliten. Dies sind zum einen hypocalcämische Zustände und zum anderen Knochenmineralisationsstörungen. Die Krankheiten, die mit Hypocalcämie einhergehen, stellen ein weites Feld dar, angefangen vom einfachen Vitamin D Mangel über hereditäre Pseudo-Vitamin D-Mangel-Rachitis Typ I und Typ II über primären und sekundären Hyperparathyreoidismus bis zum wohl wichtigsten Komplex der chronischen Niereninsuffizienz.

Die Einteilung der bedeutsamsten Osteomalazieformen läßt sich in drei Gruppen vornehmen. Ein Problemkreis stellt die Osteomalazie aufgrund chronischen Vitamin D Mangels dar, ein zweiter umfaßt die Vielzahl von Stoffwechselstörungen, die bei der Aktivierung des Vitamin D und bei der weiteren Metabolisierung auftreten können, und ein dritter die tubulären Funktionsstörungen, zum Beispiel Phosphatdiabetes und renale tubuläre Acidose (KRUSE, 1985).

Neben Vitamin D werden heute in der Therapie vor allem seine Metaboliten $25(\text{OH})\text{D}_3$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eingesetzt, aber auch $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und synthetische Analoga wie $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$. Während Vitamin D vor allem beim reinen Vitamin D Mangel ohne Stoffwechselstörungen verwendet wird, finden $25(\text{OH})\text{D}_3$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gerade dort ihren bevorzugten Einsatz, wo ihre Synthese gestört ist, also zum Beispiel bei chronischen Leber- bzw. Nierenerkrankungen. Der Hauptnachteil ist jedoch, daß dabei die körpereigene feinabgestimmte Regulation überfahren wird. Die therapeutische Breite ist äußerst schmal. Das $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kann heute nicht mehr als Vitamin betrachtet werden, sondern muß als ein calcitropes Hormon gesehen werden. Zudem gibt es Hinweise, daß bei $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Therapie eine bestehende Niereninsuffizienz sich noch weiter verschlechtert (FLURY und HALDIMANN, 1981; CHRISTIANSEN, 1983).

Durch Kombination von D-Metaboliten wurde versucht, selektive Wirkungen auf Darmresorption von Calcium und Knochenmineralisation zu erzielen.

Dabei auftretende Effekte können durch Verringerung der Dosis bei gleichbleibender Wirkung therapeutisch genutzt werden (PÖCK und JUAN, 1985).

So fand sich im Tierversuch bei der Kombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ein überadditiver Effekt auf das Calcium-Binding-Protein (CaBP) am Darm des Hühnerkükens und auf das Eischalengewicht der japanischen Wachtel (RAMBECK und ZUCKER, 1985).

In den vorliegenden Untersuchungen wurden verschiedene D_3 -Metaboliten und deren Kombinationen im prophylaktischen Fütterungsversuch an rachitischen Hühnerküken getestet. Dabei wurde speziell die Wirkung von $25,26(OH)_2D_3$; $1,25,26(OH)_3D_3$; $24,25(OH)_2D_3$; $1,24,25(OH)_3D_3$; $1\alpha(OH)D_3$ und $25(OH)D_3$ untersucht.

Nachdem in der Literatur Hinweise auf die Beeinflussung der Vitamin D Wirkung durch Vitamin C zu finden waren (WEISER und SCHLACHTER, 1986) wurde in zwei Versuchen die Wirkung einer zusätzlichen Vitamin C Supplementierung untersucht.



2. Literaturübersicht

Vitamin D wird entweder mit der Nahrung aufgenommen oder in der Haut selbst gebildet. Nach FLURY und HALDIMANN (1981) werden 70 bis 90 % im Körper selbst gebildet, Vitamin D ist demzufolge kein echtes Vitamin, sondern erfüllt mit seinem Metaboliten $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die klassische Hormondefinition. Die Bezeichnung "Vitamin" ist also vor dem historischen Hintergrund zu sehen.

2.1. Vitamin D_3 -Stoffwechsel

Eidotter, Milchfett und Fischleberöle stellen die wichtigsten Vitamin D_3 -Quellen der menschlichen Nahrung dar. Zusammen mit anderen fettlöslichen Substanzen wird Vitamin D_3 im Dünndarm absorbiert, in die Chylomikronen eingebaut und über die Lymphe abtransportiert.

Die körpereigene Biosynthese von Vitamin D_3 findet im Stratum germinativum der Haut statt. Die Epidermis enthält ca. 50 % des gesamten 7-Dehydrocholesterols (Provitamin D_3) der Haut, davon befinden sich wiederum 80 % im Stratum spinosum und im Stratum basale. UV-Licht mit einer Wellenlänge von 290-315 nm durchdringt die obersten Zellschichten der Haut und wird vom B-Ring des 7-Dehydrocholesterols absorbiert. Dadurch wird der B-Ring zwischen C-9 und C-10 aufgespalten. Es entsteht Prävitamin D_3 . Prävitamin D_3 wird durch weitere UV-Absorption zu den biologisch inerten Produkten Lumisterol und Tachysterol umgewandelt. Der größte Teil des Prävitamin D_3 isomerisiert jedoch zu Vitamin D_3 (KOLICK et al., 1980). Bei Körpertemperatur sind ca. 7% Prävitamin D_3 , 15% Lumisterol und Tachysterol und 78% Vitamin D_3 vorhanden. Dabei ist

interessant, daß bisher unbekannte Faktoren die Umwandlung von 7-Dehydrocholesterol in Vitamin D₃ auf 7 % der theoretisch denkbaren Menge begrenzen (LAWSON, 1984). In der menschlichen Haut werden pro cm²/h ca. 10 I.E. D₃ produziert (FLURY und HALDIMANN, 1981).

Über die Hautkapillaren wird Vitamin D₃ rasch absorbiert. Im Blut wird es an ein spezifisches Vitamin D-Binding-Protein (DBP), ein α -Globulin gebunden und zur Leber transportiert (BOUILLON and Van BAELEN, 1981). Das DBP besitzt eine höhere Affinität für die Vitamin D₃-Metaboliten 25(OH)D₃ und 24,25(OH)₂D₃ als für Vitamin D₃ selbst (HADDAD and WALGATE, 1976). Die Bedeutung einer 90 % Überschußkapazität des DBP ist unbekannt (FRASER, 1981).

In der Leber wird Vitamin D₃ am C-25-Atom hydroxyliert. Das hierfür verantwortliche Enzym ist eine mikrosomale, Cytochrom P-450 abhängige, mischfunktionelle Oxydase. Außer der mikrosomalen 25-Hydroxylase existiert noch eine 25-Hydroxylase in den Mitochondrien, jedoch besitzt dieses Enzym eine viel höhere Michaeliskonstante und ist nicht für Vitamin D₃ spezifisch (DeLUCA, 1981). Das in der Leber gebildete 25(OH)D₃ wird, an DBP gebunden, zur Niere transportiert. Die Niere stellt einen wichtigen Verzweigungspunkt des Vitamin D-Stoffwechsels dar. In der Niere werden eine Vielzahl von Vitamin D-Metaboliten gebildet, von denen der wichtigste, das 1,25(OH)₂D₃, die hormonell aktive Form des Vitamin D₃ darstellt (BROMMAGE and DeLUCA, 1985). Diese Reaktion wird katalysiert von einer in den Mitochondrien der proximalen Tubuluszellen lokalisierten mischfunktionellen Monooxygenase aus NADPH, molekularem Sauerstoff, einem Flavoprotein, einem Eisen-Schwefel-Protein und einem Cytochrom P-450 (DeLUCA 1981).

Auf die Bedeutung der mikrofilamentösen und mikrotubulären Elemente des Cytoskelettes weisen TAFT und LARKINS hin. Durch die Hemmstoffe Cytochalasin B und Vinblastin wird der Transport von neugebildeten 1,25(OH)₂D₃ aus den

Mitochondrien heraus verhindert und ein Rückstau von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verursacht eine Synthesehemmung (TAFT and LARKINS, 1986).

Ein weiterer wichtiger Metabolit in der Niere ist das $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ das durch die renale $25(\text{OH})\text{D}_3$ -24-Hydroxylase gebildet wird. Dieses Enzym ist wie die $25(\text{OH})\text{D}_3$ -1 α -Hydroxylase in den Mitochondrien der proximalen Tubuluszellen lokalisiert (KNUTSON and DeLUCA, 1974). Sowohl in Nierenhomogenaten als auch im Serum von Ratten konnten 95 % des vorhandenen $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ als $24\text{R},25(\text{OH})_2\text{D}_3$ identifiziert werden. $24\text{R},25(\text{OH})_2\text{D}_3$ entsteht durch 24-Hydroxylierung von $25(\text{OH})\text{D}_3$, während wenige Prozent des $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf einem alternativen Weg entstehen, nämlich durch Reduktion von $24(\text{OH})$ -24-oxo-Vitamin D_3 . Dabei entsteht fast ausschließlich $24\text{S},25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (ISHIZUKA et al., 1984). Die Bedeutung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist trotz intensiver Forschung noch immer umstritten, doch finden sich extrarenale Aktivitäten der $25(\text{OH})\text{D}_3$ -24-Hydroxylase in zahlreichen Geweben, so zum Beispiel im Knorpel und Knochen (GARABEDIAN et al., 1978; BAYLINK et al., 1982) und in der Dünndarmmucosa (KUMAR et al., 1978).

Bei normal funktionierendem Nierengewebe stellt die extrarenale 24-Hydroxylierung einen minimalen Teil der gesamten Kapazität dar, doch nimmt bei abnehmender Nierenfunktion der Anteil der extrarenalen C-24-Hydroxylierung bis auf 50 % der Hydroxylierungskapazität der normal funktionierenden Nieren zu (RICKERS et al., 1985).

BOYLE et al. (1973) wiesen nach, daß unter normalen und hypercalcämischen Bedingungen das $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ der hauptsächliche im Blut zirkulierende Metabolit ist. Sie entdeckten auch, daß $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Niere zu einem weiteren Metaboliten mit größerer Polarität umgebaut werden kann. Dieser Metabolit konnte kurze Zeit später als $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ identifiziert werden (HOLICK et al., 1973).

FRIEDLANDER und NORMAN (1975) konnten den Metaboliten in Kükennierenhomogenaten nachweisen, sie fanden ihn aber nicht in vivo. Während die Ratte $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aus $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ und $24(\text{OH})\text{D}_3$ herstellen kann, benötigt die 1α -Hydroxylase der Kükenniere eine Hydroxylgruppe am C-25 (TANAKA et al., 1977). Eine extrarenale 24-Hydroxylase wurde im Rattendarm gefunden, so daß bei dieser Spezies durch eine Nephrektomie die Bildung von $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ aus $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nicht verhindert wird. Möglicherweise ist dieser Schritt bedeutsam für eine Modulierung der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Wirkung am Rattendarm (KUMAR et al., 1978).

$25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurde 1970 von SUDA entdeckt (SUDA et al., 1970). Es wurde im menschlichen Plasma (PARTRIGE et al., 1981), in Nierenzellkulturen von Küken (TANAKA et al., 1975) und im Plasma von Vitamin D_3 supplementierten Kühen gefunden (REINHARDT et al., 1981). Eine Nephrektomie hat keinen wesentlichen Einfluß auf den $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ Blutspiegel, was auf eine extrarenale $25(\text{OH})\text{D}_3$ -26-Hydroxylase schließen läßt. Für das $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird eine rein exkretorische Funktion angenommen, da eine C-26-Hydroxylierung die biologische Aktivität noch stärker reduziert als eine C-24-Hydroxylierung (TANAKA et al., 1981). Es scheinen beide Stereoisomere $25\text{R},26(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $25\text{S},26(\text{OH})_2\text{D}_3$ produziert zu werden, doch ist die Bindungsaffinität von $25\text{R},26(\text{OH})_2\text{D}_3$ an DBP im Serum ca. dreifach höher (BIKLE et al., 1984). Durch Inkubation von $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit Kükennierenhomogenaten von Vitamin D unterversorgten Küken oder durch Inkubation von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit Nierengewebe von Vitamin D supplementierten Küken konnte ein weiterer Metabolit produziert werden, der eine ähnliche Polarität wie $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ aufwies. Es handelt sich um $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$, für das in vivo ebenfalls eine exkretorische Funktion vermutet wird (TANAKA et al., 1981).

Bis heute sind mehr als 30 Vitamin D-Metaboliten identifiziert, die überwiegend als Abbauprodukt angesehen

werden (JARNAGIN et al., 1985). Es seien lediglich noch "Calcitroic Acid" (ESVELT, et al., 1979) und 25R(OH)-26,23S-lacton (HENRY and NORMAN, 1984), zwei Hauptabbauprodukte von Vitamin D₃, erwähnt. Vitamin D Abbauprodukte in Form von Glukuroniden und Sulfaten finden sich auch in der Gallenflüssigkeit. Zum Teil unterliegen die über die Galle ausgeschiedenen Metaboliten einem enterohepatischen Kreislauf (NAGUBANDI et al., 1981).

2.2. Regulation des Vitamin D₃-Stoffwechsels

Die aktive Form des Vitamin D₃, das 1,25(OH)₂D₃ setzt aufgrund der hormonähnlichen Wirkung eine feinabgestufte Regulation voraus. Während 25(OH)D₃ starken Schwankungen unterworfen ist, bewegt sich der Blutspiegel von 1,25(OH)₂D₃ in engen Grenzen.

Orale oder parenterale Gaben von Vitamin D₃ bedingen einen starken, jedoch nicht unbegrenzten Anstieg von 25(OH)D₃ (MAWER, 1983). Neu gebildetes 1,25(OH)₂D₃ scheint die 25-Hydroxylase in der Leber zu hemmen (BELL et al., 1984). Auf welche Weise dies geschieht ist unklar, da bisher in der Leber keine 1,25(OH)₂D₃-Rezeptoren gefunden werden konnten (BELL, 1985). Neuerdings gibt es Hinweise, daß auch ein hoher Parathormonspiegel die 25(OH)D₃ Konzentration beeinflusst. So fand sich ein gesteigerter hepatischer Abbau von 25(OH)D₃ zu unwirksamen Metaboliten bei Ratten, die calciumarm ernährt wurden und demzufolge einen sekundären Hyperparathyreoidismus entwickelten. Parathyreoidektomie verhinderte die schnelle Metabolisierung (CLEMENTS et al., 1986).

Die Wirkung von 1,25(OH)₂D₃ als calcitropes Hormon setzt eine enge Regulation der 1 α -Hydroxylase der Nieren voraus. Den größten Einfluß übt der Vitamin D Status der Nierzelle

aus. Daß dies ein direkter und kein indirekter Effekt ist, konnte an Nierenzellkulturen von Küken, Wachteln und Mäusen bewiesen werden. In Abwesenheit von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zeigt die 1α -Hydroxylase maximale Aktivität, während die 24 -Hydroxylase nicht nachweisbar ist. Bei Inkubation mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kehrt sich die Enzymaktivität um, und die 24 -Hydroxylase produziert maximale Mengen von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (HENRY, 1979).

Ein wirksamer Stimulator der 1α -Hydroxylase der Nieren ist das Parathormon (PTH). Rezeptoren für PTH finden sich in der Niere hauptsächlich in den Zellen des proximalen Tubulus, dem Sitz der 1α -Hydroxylase (DIETEL et al., 1986). Dabei erfolgt die Wirkung des PTH auf zwei Wegen, die aber eng verknüpft sind. Einmal ergibt sich ein PTH induzierter Anstieg des Cycloadenosinmonophosphat (cAMP), und zum anderen erfolgt eine cAMP-unabhängige Membrandepolarisation mit Calciuminflux (FRITSCH et al., 1986). Sinkt der Calciumspiegel des Blutes, wird PTH sezerniert und die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Konzentration steigt. Durch Parathyreoidektomie wird dieser Anstieg verhindert, was nahelegt, daß dieser Effekt des Calciumspiegels nur indirekt über PTH vermittelt wird (GARABEDIAN et al., 1972). Niedriges Serumphosphat stimuliert die 1α -Hydroxylase direkt, ohne Beteiligung des PTH. Hyperphosphatämie dagegen senkt die Synthese von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (DeLUCA and GHAZARIAN, 1980). Ob dieser Effekt direkt oder indirekt ist, bleibt unklar, da bei Inkubation von Kükennierenzellkulturen mit wechselnden Konzentrationen von Calcium und Phosphor keine Reaktion des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegels hervorgerufen werden konnte (TRECHSEL et al., 1979).

PAULSON und KENNY (1985) fanden, daß eine Hypophosphatämie in der Lage ist, die Plasma-Halbwertszeit von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei Ratten zu verdoppeln. Über die Rolle des Calcitonins herrscht Unklarheit, da sowohl über eine Stimulation (LARKINS et al., 1974) als auch über eine Hemmung (RASMUSSON

et al., 1972) der 1α -Hydroxylase berichtet wird. Neuere Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, daß Calcitonin nicht an der Regulation der 1α -Hydroxylase beteiligt ist (HENRY et al., 1982).

Während der Legeperiode von Vögeln werden stark erhöhte $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegel gemessen (TANAKA et al., 1978). Gleiches gilt für Säugetiere während der Trächtigkeit (hier existiert außerdem eine 1α -Hydroxylase in der Plazenta) und während der Laktation (HALLORAN et al., 1979; PIKE et al., 1979). Östrogen erhöht den Blutcalciumspiegel durch verstärkte Mobilisierung von Calcium aus dem Skelett, wofür wiederum das $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine maßgebliche Rolle spielt. Testosteron zeigte dagegen keine Wirkung (KHANDEKAR et al., 1986). Für Östrogen wird ein indirekter Mechanismus vermutet, da eine Stimulation der 1α -Hydroxylase in Zellkulturen durch Inkubation mit Östrogen nicht beobachtet werden konnte (HENRY, 1981). Möglicherweise beruht der Effekt von Östrogen auf der Erhöhung von DBP im Blut. Dadurch fällt die Konzentration an freiem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, was eine gesteigerte 1α -Hydroxylaseaktivität zur Folge hat (BOUILLON et al., 1981).

Glucocorticoide verursachen eine verminderte Calciumabsorption aus dem Darm und parallel damit einen Anstieg der PTH-Sekretion (FUCIK et al., 1975). Grund dafür ist nicht, wie früher vermutet, eine geringere Synthese von $25(\text{OH})\text{D}_3$ (AVIOLI et al., 1968) oder eine Hemmung der 1α -Hydroxylase (CHESNEY et al., 1978), sondern eine forcierte Metabolisierung von $25(\text{OH})\text{D}_3$, während die 1α -Hydroxylase unbeeinflusst bleibt (COLETTE et al., 1986).

Beim Küken wurde ein stimulierender Einfluß von Prolaktin auf die 1α -Hydroxylase festgestellt wurde (SPANOS et al., 1976), jedoch nicht bei der Ratte (MATSUMOTO et al., 1979). Nach früheren gegenteiligen Berichten konnte mittlerweile

auch beim Menschen ein steigender Einfluß von Prolaktin auf die 1α -Hydroxylase nachgewiesen werden (HAINING et al., 1986).

Die mögliche Beteiligung des Wachstumshormons STH an der Regulation der 1α -Hydroxylase ist noch unklar. Hypophysektomie bei Ratten führte zu einem niedrigen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegel. Phosphatmangel war in diesem Fall nicht in der Lage, einen Anstieg der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration hervorzurufen, wie dies bei intakten Ratten der Fall ist (GRAY et al., 1981). Substitution von STH stellt die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration wieder auf normale Höhe ein und stellt auch die Anpassungsfähigkeit an Phosphormangel wieder her (GRAY et al., 1983). Dagegen konnte bei Kindern, die unter STH-Mangel litten, kein Effekt auf das $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ festgestellt werden (GERTNER et al., 1979). Über einen stimulierenden Effekt von Vitamin C auf die 1α -Hydroxylase in vivo berichten WEISER und SCHLACHTER (1986).

TANAKA und DeLUCA entdeckten 1973, daß durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Produktion von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gefördert wird. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist die am stärksten wirksame Substanz bezüglich der Induktion der 24-Hydroxylase. Möglicherweise wird dieser Effekt innerhalb ein und derselben Nierenzelle vermittelt, ohne Beteiligung des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Blutspiegels (REDDY et al., 1983). Durch in vitro Versuche konnte nachgewiesen werden, daß $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die 24-Hydroxylase in einer von Zeit und Dosis abhängigen Weise stimuliert, indem V_{max} des Enzyms erhöht wird. Parathormon wiederum hemmt diese Stimulation der 24-Hydroxylase mittels einer Änderung der cAMP-Konzentration (MATSUMOTO et al., 1985). Außer dem cAMP-Spiegel spielt auch die calciumsensitive, phospholipidabhängige Protein-Kinase C eine Rolle (HENRY, 1986). Die alternative Beziehung zwischen 1α -Hydroxylase und 24-Hydroxylase erklärt auch, warum bei Inkubation von Nieren-, Darm- oder Knorpelzellen mit $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$, dem

synthetischen Analogon vom $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, keine Umwandlung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ stattfindet (NOFF et al., 1978).

Die gleichen Faktoren, die die $25(\text{OH})\text{D}_3$ -24-Hydroxylase stimulieren, wirken auch auf die 26-Hydroxylase. So wurde $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ nur im Serum von Ratten nachgewiesen, die pharmakologische Dosen von Vitamin D_3 erhalten hatten (IKEKAWA et al., 1983). Bei Milchkühen, denen hohe Vitamin D_3 -Injektionen verabreicht wurden, konnte ein paralleler Anstieg von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ gemessen werden (REINHARDT et al., 1981).

2.3. Funktion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei der Regulation der Calciumhomöostase:

Im Calcium-Regelkreis stellt die Parathyreoidea das calcium-sensitive Organ dar. Ein Absinken des Calcium-Blutspiegels wird von der Nebenschilddrüse mit vermehrter PTH-Sekretion beantwortet (GARABEDIAN et al., 1974). Dabei wird nicht, wie bisher angenommen, die Parathyreoidea durch einen niedrigen Calciumspiegel stimuliert, sondern eine autonome Basalsekretion (SINGH et al., 1986) wird durch eine ansteigende Calcium-Konzentration gehemmt (SHERWOOD et al., 1986). Die Parathyreoidea reagiert auf Schwankungen im Calcium-Blutspiegel jedoch nur, wenn ein Minimum an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vorhanden ist (SINGH et al., 1986). Möglicherweise ist die Aktivierung von Protein-Kinase C für die Vermittlung des Calciumspiegels an die Zellen der Parathyreoidea verantwortlich (KOBAYASHI et al., 1986). Das gebildete Parathormon induziert in den proximalen Nierentubuli die $25(\text{OH})\text{D}_3$ -1 α -Hydroxylase, was zu einem Anstieg von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ führt. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wirkt direkt zurück auf die Parathyreoidea, die Rezeptoren mit hoher

Affinität für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ besitzt. Die Rückkopplung erfolgt auf zwei Ebenen. Niedrige Dosen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hemmen die Biosynthese von prä-pro-PTH mRNA, während höhere Dosen die Thymidinaufnahme und das Zellwachstum hemmen (BRANDI et al., 1986).

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wirkt PTH-unabhängig auf Rezeptoren in der Dünndarmmucosa, wo es die Calciumabsorption erhöht, und stimuliert zusammen mit PTH die Calciummobilisierung aus dem Knochen. Auch an den proximalen Nierentubuli wirken PTH und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zusammen auf die verstärkte Calciumrückresorption (SUTTON and DIRKS, 1978).

Die von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimulierte Calciumabsorption im Darm ist ein aktiver Transport gegen einen Konzentrationsgradienten durch die Mucosazelle hindurch, der in zwei Stufen erfolgt. Calcium gelangt durch passive Diffusion aus dem Darmlumen durch die Mikrovillimembran in die Mucosazelle hinein. An der Basalseite zum Blut hin findet eine energieabhängige Exkretion durch eine Calciumpumpe statt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Diffusion von Calcium durch die Mikrovillimembran (FRASER, 1981).

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bewirkt wie andere Stereoidhormone über spezifische Rezeptoren eine Genexpression im Zellkern, wobei über Transkription und Translation Proteine synthetisiert werden. Der Rezeptor für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ befindet sich zu 70 % in der Kernfraktion. Durch Bindung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gewinnt er eine höhere Affinität zu Chromatin (WALTERS et al., 1980 und 1981). Es konnte eine mRNA für die Synthese von Calcium-Binding-Protein (CaBP) im Kükendarm nachgewiesen werden, die spezifisch von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induziert worden war (SPENCER et al., 1978).

Die am besten meßbare Hormonantwort im Darm ist die Bildung von Calcium-Binding-Protein (WASSERMAN et al., 1968). Der CaBP-Gehalt der Mucosazellen geht parallel mit der Calciumabsorption aus dem Darm. Sehr wahrscheinlich hat es

die Aufgabe, toxische Konzentrationen von freiem Calcium im Cytosol zu verhindern (WASSERMAN and FULLMER, 1983).

Während Küken nur ein einziges CaBP mit einem Molekulargewicht (MG) von 28000 besitzen, kommt bei Säugetieren zusätzlich noch ein 10000 MG CaBP vor. In den verschiedensten Geweben wurde CaBP gefunden, so zum Beispiel bei der Ratte in Duodenum, Jejunum, Caecum, Thymus, Pankreas, Niere, Knochen, Lunge und Cerebellum, etc. (THOMASSET et al., 1982). Mittlerweile wurden noch zwei weitere CaBP-Klassen gefunden: ein 9000 MG CaBP in der Haut und ein 6000 MG CaBP im Knochen. Das 10000 (8000-11000) MG CaBP im Säugerdarm bindet zwei Grammatom Calcium pro Mol, während das 28000 MG CaBP im Kükendarm in der Lage ist, vier Grammatom Calcium pro Mol zu binden. Es ist möglich, daß das aviäre 28000 MG CaBP ein Dimer des 10000 MG (8000-11000) der Säuger darstellt (NORMAN, 1984).

BISHOP et al. (1983) fanden eine Calciumabsorption frühestens vier Stunden nach Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Vorher war in jedem Fall eine CaBP-Synthese festzustellen. Dagegen berichten FULLMER et al (1984) von einem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Effekt auf die Calciumabsorption ohne vorherige CaBP-Synthese. Dabei wird jedoch kein Calciumtransfer ins Blut beobachtet, sondern eine Akkumulation in der Darmmucosa.

Im Zusammenhang mit dem ersten Schritt der Calciumabsorption aus dem Darmlumen scheint eine Veränderung der Mikrovillimembran zu stehen (RASMUSSEN et al., 1982; WASSERMAN et al., 1982). Diese geht einher mit einer gesteigerten Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase und einer calciumabhängigen ATPase, sowie mit Veränderungen im Phospholipidstoffwechsel (FRASER, 1981). Die mögliche Rolle der Lipidzusammensetzung der Mikrovillimembran wird dadurch unterstrichen, daß Mangel an essentiellen Fettsäuren (HAY et al., 1980) oder Hemmstoffe des Metabolismus von essentiellen Fettsäuren (NOWICKI et al., 1972) die Stimulation der intestinalen Calciumabsorption durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aufheben.

Über eine Beteiligung des Polyaminmetabolismus und der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induzierten Ornithindecaboxylase an der Calciumabsorption in vivo berichten LUCAS et al. (1986).

NEMERE und NORMAN (1986) konnten zeigen, daß durch Hemmstoffe der Mikrotubuli und Lysosomen der schnelle Effekt von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (innerhalb 4-7 Minuten) auf die Calciumabsorption aufgehoben werden kann. Daraus schließen sie, daß Calcium durch Endocytosevesikel in die Mucosazelle gelangt. Dort findet eine Verschmelzung mit Lysosomen statt. Die Ausschleusung des Calciums erfolgt über Exocytose.

Gegenüber den Vorgängen am Darm ist über die Calciummobilisation aus dem Knochen weit weniger bekannt. Es steht außer Frage, daß $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Calciummobilisation aus dem Knochen erhöht (HOLTROP et al., 1981; TINKLER et al., 1981). Andererseits muß es auch eine $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ unabhängige Knochenresorption geben, sonst wäre eine erhöhte Calciumresorption aus dem Skelett unter Vitamin D-Mangel bzw. bei chronischer Niereninsuffizienz mit fehlender 1α -Hydroxylierung nicht möglich.

Überraschenderweise enthalten Osteoklasten keine $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Rezeptoren (NABAITZ et al., 1983). Dagegen konnten in Osteoklastenvorläuferzellen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Rezeptoren mit hoher Affinität festgestellt werden (NABAITZ et al., 1981).

Die Vorläufer der Osteoklasten scheinen aus dem Monozyten/Makrophagen-System zu stammen. Unter Einwirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ fusionieren Makrophagen innerhalb von 2-3 Tagen zu 80 % zu mehrkernigen Riesenzellen mit BCM-(Bone Calcium Mobilisation)-Aktivität. Die Fusionsrate konnte durch Inkubation mit Vitamin A signifikant gesteigert und durch gamma-Interferon deutlich reduziert werden (SUDA, 1986). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ führte zu einem erheblichen Ansteigen der Interleukine 1 und 3 bei in vitro-Versuchen (HODLER et al., 1985). Vor allem Interleukin 1 und ein von T-Lymphozyten produzierter "osteoclast-activating-factor" (OAF)

stimulieren die BCM-Rate in vitro (GOWEN et al., 1983; HORTON et al., 1974). Für eine direkte Beteiligung der intrazellulären Calciumkonzentration in Osteoblasten sprechen sich TETI und ZALLONE (1986) aus. Sie stellten fest, daß sich durch niedrige Calciumkonzentration im Kulturmedium die Zahl der Zellen mit typischen "adhesion areas" signifikant erhöht und die Alkalische Phosphatase an Aktivität gewinnt.

Die Wirkungsweise des PTH bei der Knochenresorption konnte neuerdings aufgeklärt werden. So wurde festgestellt, daß $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Aktivität der Osteoklasten erhöht, während PTH die Anzahl der Zellen reguliert. Die Osteoblastenzahl stieg bei PTH-Inkubation auf das Doppelte, während sich die Zahl der Osteoklasten verdreifachte (MALLUCHE et al., 1986).

Den dritten Angriffspunkt des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stellt nach Darm und Knochen die Niere dar, wo durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, zusammen mit PTH die Reabsorption von Calcium aus dem Primärharn gefördert wird (SUTTON and DIRKS, 1978). Die im proximalen Tubulus stattfindende Rückresorption stellt möglicherweise einen indirekten Effekt dar, da nach Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bis zu einem nachweisbaren Anstieg der Calciumrückresorption mehrere Tage verstreichen (KANIS, 1982). Auch eine gesteigerte Phosphatrückresorption in der Niere wird durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hervorgerufen (PUSCHETT et al., 1972).

2.4. Mögliche Beteiligung von Vitamin-D Metaboliten bei der Knochenmineralisation

Ausgehend von der Beobachtung, daß Vitamin D-Mangel oder Störungen der Vitamin D-Metabolisierung eine gestörte Knochenmineralisation zur Folge haben, wird von zahlreichen Autoren über die Steigerung der Knochenasche durch

Verabreichung von unterschiedlichen Vitamin D Metaboliten an rachitische Versuchstiere berichtet. Meist handelt es sich dabei um Metaboliten, die wie zum Beispiel $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ in Niere oder Darm durch eine 1α -Hydroxylase aktiviert werden können und dann eine Wirkung am $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Rezeptor entfalten. Bei nephrektomierten Ratten ist z.B. $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ unwirksam, weil eine renale Metabolisierung zu $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ dann nicht möglich ist (WALLING et al., 1977). Gleiches gilt für $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ (THOMASSET et al., 1979).

Nach UNDERWOOD und DeLUCA (1984) ist die Anwesenheit von Vitamin D-Metaboliten überhaupt nicht notwendig. Sie vermuten, daß der mineralisierungsfördernde Effekt von Vitamin D darin besteht, einen optimalen Blutspiegel von Calcium und Phosphor aufrecht zu erhalten. Dennoch mehren sich die Anzeichen, daß Vitamin D-Metaboliten zumindest teilweise an der Knochenmineralisation beteiligt sind. So konnte für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und für $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ jeweils in Kombination mit PIK eine synergistische Wirkung auf die Mineralisation von Kükenfemura in vitro festgestellt werden (ENDO et al., 1980). Ähnliche Ergebnisse berichten ORNOY et al. (1978). Sie fanden, daß $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in Kombination mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nötig war, um eine optimale Mineralisation zu erreichen. Auch bei rachitischen Ratten konnte die Bedeutung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ für die normale Knochenmineralisation neben $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ bzw. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durch licht- und elektronenmikroskopische Studien herausgestellt werden (ATKIN et al., 1985).

NOFF et al. (1978) fanden eine hohe Konzentration von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Knochen, dagegen wenig $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, was nahelegt, daß $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Knochen lokal wirksam ist, unabhängig von einer vorhergehenden 1α -Hydroxylierung in der Niere. In proliferierenden Chondroblasten des Epiphysenknorpels konnte eine $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Anreicherung vor allem in den Zellkernen nachgewiesen werden. Die

Chondroblasten des Epiphysenknorpels können somit als ein Zielorgan von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ angesehen werden (FINE et al., 1985).

Kaninchenchondrozyten zeigen in Zellkulturen eine vom Reifestadium der Zellen abhängige Rezeptorsynthese. Sich teilende, unreife Zellen besitzen nur den $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Rezeptor, während reife Zellen zusätzlich noch $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Rezeptor-Proteine bilden (CORVOL et al., 1985). Osteoblasten und Chondrozyten bilden Matrixproteine, deren Synthese von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimuliert wird, so zum Beispiel Osteocalcin (=glu-protein), Hyaluronsäure und Phosphoproteine (WONG et al., 1977; LIAN et al., 1982). CAPLAN et al. (1986) konnten nachweisen, daß Chondroblasten $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bilden und daß $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die 24-Hydroxylase aktiviert. Das gebildete $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hemmt die Proteoglycansynthese und wirkt so regulierend auf die Bildung von Knochenmatrix.

Trotz dieser zahlreichen Hinweise auf eine Beteiligung von Vitamin D-Metaboliten bei der Knochenmineralisation geben BROMMAGE und DeLUCA (1985) zu bedenken, daß $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zwar den "Bone turnover" erhöht, daß diese erhöhte Umbaurate jedoch nicht notwendigerweise eine Nettomineralisation darstellen muß.

2.5. Wirkung von Vitamin D-Metaboliten auf andere Zielorgane:

BIRGE und HADDAD (1975) fanden einen ATP-Anstieg in Muskelzellen nach Inkubation mit $25(\text{OH})\text{D}_3$. GIULIANI und BOLAND (1984) stellten bei in vitro Versuchen einen direkten fördernden Einfluß von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $25(\text{OH})\text{D}_3$ auf den Calciumeinstrom in die Muskelzelle fest. $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erwies sich als unwirksam. Sie vermuten, daß eine Änderung der

Lipidzusammensetzung der Muskelzellenmembran stattfindet, ähnlich der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Wirkung auf die Darmmucosa.

In der Cauda epididymidis werden hohe $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Konzentrationen gefunden, die mit der Regulation des cytoplasmatischen Calciumniveaus in Verbindung gebracht werden (KIDRONI et al., 1983).

Auf die Bedeutung des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ für den physiologischen Ablauf der Insulinsekretion haben KADOWAKI und NORMAN (1985) hingewiesen. Vitamin D-Metaboliten spielen eine vielfältige Rolle im Immunsystem. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ fördert die Bildung von Interleukin 1 und 3 und hemmt Interleukin 2 (HODLER et al., 1985). Es induziert ebenfalls die Differenzierung von Leukämiezellen durch einen Rezeptor-vermittelten Mechanismus (TANAKA et al., 1982). Rezeptoren für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurden auch in T- und B-Lymphozyten nach Aktivierung durch Epstein-Barr-Virus gefunden (PROVEDINI et al., 1983).

In fast allen Organen sind spezifische "Calcium-Binding-Proteins" nachgewiesen worden (THOMASSET et al., 1982). Das unterstreicht die breitgefächerte Wirkung von Vitamin D-Metaboliten in zahlreichen biologischen Systemen.

2.6. Kombinationseffekte von Vitamin D-Metaboliten:

HORST et al. (1983) berichten über ein Ansteigen des Serum- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegels bei Kühen nach Injektion von $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$. Möglicherweise hemmt $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ die Metabolisierung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Die meisten Kombinationseffekte werden von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ berichtet. Die unter Vitamin D-Mangel hypertrophierte Parathyreoidea von Hühnerküken benötigt zur Regression sowohl $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ als auch $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (HENRY et al., 1977). Bei der Untersuchung von 22 Parametern, die mit dem Vitamin D-Status in Beziehung stehen, konnten NORMAN et al. (1980) nur bei Kombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ den gleichen Effekt, wie mit Vitamin D_3 erzielen. Auf die zahlreichen Interaktionen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Knorpel- und Knochenstoffwechsel wurde bereits eingegangen. Synergistische Wirkungen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in Bezug auf die antirachitische Wirksamkeit, gemessen an CaBP, Calcium-spiegel im Blut und Knochenasche konnten von BABARYKIN et al. (1982) festgestellt werden. Da eine Hemmung der 1α -Hydroxylase diesen Synergismus verhindert, wird angenommen, daß eine Umwandlung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ notwendig ist, was von RAMBECK et al. (1986) nachgewiesen werden konnte.

Der Anstieg der Calcium-Konzentration im Harn ist 24 Stunden nach s.c. Injektion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ größer als nach kombinierter Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (WALD et al., 1985). Eine dämpfende Wirkung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf den Serum-Calciumanstieg nach $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Gabe wird von DUNSTAN et al. (1985) berichtet. Sie postulierten, daß nicht ein Calcium-Shift in das Skelett die Ursache ist, sondern eine hemmende Wirkung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Calciumabsorption im Darm.

In der Tat konnte nachgewiesen werden, daß der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Rezeptor im Kükendarm über eine Bindungsstelle für $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verfügt. Es wird vermutet, daß dadurch die Rezeptoraffinität reguliert wird.

In Versuchen mit verschiedenen Zelllinien, z. B. Schweine-nierenzellen, menschlichen Hautfibroblasten und Mammakar-zinomzellen konnte durch Zugabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Zahl der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Rezeptoren um 200-400 % gesteigert werden. Die Affinität des Rezeptors zum Hormon blieb davon unbeeinflusst. Dieser Effekt war auch mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ zu erreichen. Die benötigte Dosis spiegelt die Bindungsaffinität der D_3 -Metaboliten zum Rezeptor wieder (COSTA et al., 1985).

2.7. Interaktionen zwischen Vitamin D-Wirkung und anderen Vitaminen

Die Beteiligung von Vitamin A bei der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induzierten Fusion von Osteoklastenvorläufern zu mehrkernigen Riesenzellen wurde bereits erwähnt. Den Einfluß von Vitamin C auf die Bildung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und andere Vitamin D-bezogene Parameter haben WEISER und SCHLACHTER (1986) am Hühnerküken untersucht. Bis zum Alter von 15 Tagen ist beim Küken die L-Gulonolaktoneoxydase insuffizient. Zu dieser Zeit können Küken ihren Bedarf an Vitamin C also nicht durch Eigensynthese decken (HORNIG und FRIGG, 1979). Vitamin C wird bei der Bildung von Kollagenfasern benötigt. Dabei wirkt es an der Synthese von Hydroxyprolin und Hydroxylysin aus Prolin und Lysin mit (STÜNZI und WEISS, 1982).

WEISER und SCHLACHTER (1986) fanden nun, daß neben der Funktion bei der Kollagensynthese auch direkt die 1α -Hydroxylase stimuliert wird. Nach Gabe von Vitamin C stiegen die Plasmakonzentrationen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und Calcium, die Bindungsfähigkeit des CaBP wurde erhöht, der Phosphorspiegel und die Alkalische Phosphatase wurden erniedrigt.

Dagegen stellten SUGIMOTO et al. (1986) fest, daß Vitamin C die Aktivität der Alkalischen Phosphatase bei einer aus Osteosarkomzellen gewonnenen Zellkultur dosisabhängig steigert.

3. Eigene Untersuchungen

Die antirachitische Aktivität von Vitamin D und seinen Metaboliten $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$, $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$, $25(\text{OH})\text{D}_3$ und von Vitamin C wurde am Hühnerküken untersucht. Die Aktivität der D-Metaboliten und ihre Kombinationen wurde im prophylaktischen Fütterungsversuch mit Hilfe der Parameter Futterverzehr, Gewichtszunahme, CaBP, absoluter und relativer Knochenaschegehalt, Serumcalcium und Serumaktivität der Alkalischen Phosphatase beurteilt.

Die Dosierungen waren in einem Bereich gehalten, in dem die Dosis-Wirkungs-Kurve linear verläuft.

Dadurch lassen sich synergistische (=überadditive) Effekte durch Vergleich mit der Summe der Einzeleffekte leicht ermitteln.

Der Begriff Synergismus wird nach der Definition von PÖCK und JUAN in "Allgemeine Pharmakodynamik" (1985) verwendet.

Unter negativer Kontrolle ist die Vitamin D-frei ernährte Kontrollgruppe zu verstehen, als positive Kontrolle wurden $8\mu\text{g D}_3$ pro kg Futter eingesetzt.

3.1. Tiermaterial:

Es fanden ausschließlich männliche Broilerküken der Mastrasse "Lohmann B 975" Verwendung.

Die außergewöhnlich hohe Wachstumspotenz und damit zusammenhängend der enorme Ca-Umsatz und Ansatz lassen Störungen der Knochenmineralisation, bzw. deren Verhütung durch prophylaktische Verabreichung von D-Metaboliten innerhalb kurzer Zeit erkennen.

Die Eintagsküken wurden gesext, um bei ausschließlicher Verwendung männlicher Tiere den Einfluß von Östrogenen auf den Calciumstoffwechsel mit Sicherheit auszuschließen.

3.2. Tierhaltung:

Die Versuche wurden in einem 28 m² großen, fensterlosen Stall durchgeführt. Die Beleuchtung mittels 5 Leuchtstoffröhren ohne UV-Anteil ermöglichte keine Eigensynthese von Vitamin D₃.

Drei Elektroradiatoren dienten als Wärmequelle. Zur Gewährleistung einer optimalen Luftfeuchtigkeit waren zwei Wassergefäße aufgestellt. Die Versuchskäfige bestanden aus Plastikkisten mit 0,5 m² Grundfläche und 50 cm Höhe. Die Kästen waren der Wand entlang auf 90 cm hohen Holzgestellen aufgestellt. In den Kisten sorgte eine Torfeinstreu für Feuchtigkeitsbindung. Die Versuchsküken selbst wurden auf eingelegten Maschendrahtrosten gehalten. Die Wasserversorgung erfolgte über automatische Nippeltränken. Das Futter wurde in je zwei 7 x 7 x 37 cm großen handelsüblichen Kunststofftrögen (Besteckkästen) ad libitum angeboten.

Bei einer mittleren Luftfeuchtigkeit von 60 % und einem 24-Stunden-Lichttag betrug die Raumtemperatur in der ersten Woche ca. 32 °C und wurde dann auf 28 °C gesenkt.

3.3. Versuchsdurchführung:

Die Versuche wurden als prophylaktischer Kükentest durchgeführt. Sofort nach ihrer Ankunft wurden die Eintagsküken gewogen, in Gewichtsklassen eingeteilt und diese gleichmäßig auf die einzelnen Käfige verteilt. Hierdurch sollte eine möglichst homogene Gewichtsentwicklung gewährleistet werden. Die 10 % leichtesten Gewichte und die 10 % Schwerstgewichte wurden aussortiert. Die Anordnung der Gruppen innerhalb des Stalles geschah nach dem Zufallsprinzip. Es wurden 12 Küken pro Gruppe eingesetzt. Vom ersten Tag an bekamen die Küken eine rachitogene, halbsynthetische Diät (Tabellen 1-3). Den Rationen war gruppenspezifisch Vitamin D, ein Vitamin D Metabolit oder eine Kombination mehrerer D-Metaboliten beigemischt.

Die Versuchsperiode dauerte 21 Tage. Am Tag vor dem Versuchsende wurde den Tieren zur Identifizierung Flügelmarken eingezogen. Dabei wurden die Tiere gewogen.

Bei Versuchsende wurde den Küken mittels eines scharfen Skalpells die Vena jugularis eröffnet, das Blut aufgefangen und das Küken anschließend mit einem Genickschlag getötet. Serum und Beine für die Knochenasche wurden eingefroren, CaBP und Gesamtprotein bis zum Homogenat aufbereitet im Kühlschrank aufbewahrt und am folgenden Tag verarbeitet.

3.4. Futterzusammensetzung und -zubereitung:

Es wurde ein halbsynthetisches, Vitamin D-freies Alleinfutter nach den Tabellen 1, 2 und 3 hergestellt und gruppenspezifisch die jeweiligen Metaboliten dazugemischt. Dazu wurden die Metaboliten in einem Propandiol-Äthanol-Gemisch (9:1) gelöst und äquimolar einem Teil des mit Petroläther (30 °C - 50 °C) gut durchfeuchteten D-freien Alleinfutters beigemischt. Bei ca. 40 °C erfolgte eine schonende Eintrocknung im Wasserbad. Dabei wurden die Proben ständig durchmischt, um eine gleichmäßige Verteilung der D-Metaboliten zu gewährleisten.

Es wurden Vitamin D₃, kristallin (Firma Merck, Art. Nr. 500936) und synthetische Metaboliten eingesetzt, die freundlicherweise von Dr. W. Meier, Hoffmann-La Roche AG, Basel, zur Verfügung gestellt wurden. Die angegebenen Konzentrationen bei den einzelnen Gruppen beziehen sich im Folgenden immer auf 1 kg Futter.

Vitamin C wurde in kristalliner Form mit einer kleinen Menge Futtervormischung vermischt.

Die so erhaltenen Proben wurden im 20 kg-Mischer mit der Vormischung vermengt, so daß schließlich für jede Gruppe 10 kg Futter zur Verfügung stand.

3.5. Probenentnahme und Bestimmungsmethoden:

1. Gewichtszunahme:

Die Küken wurden am Tag der Ankunft und am Tag vor dem Versuchsende gewogen. Aus der Gewichts-differenz ergab sich die Gewichtszunahme in Gramm.

2. Futtermverzehr:

Pro Gruppe wurden exakt 10 kg Futter gemischt. Nach Versuchsende wurden die verbliebenen Mengen gewogen. Die Differenz war die gefressene Menge pro Gruppe. Ausfälle verendeter Küken während der Versuchsperiode wurden nach Tagen der Anwesenheit in die Berechnung mit einbezogen. Der Futtermverzehr wurde in Gramm pro Küken und Tag angegeben.

3. Serumgewinnung:

Zur raschen Gewinnung von ca. 5 ml Blut wurde dem mit der linken Hand fixierten Küken die Vena jugularis dexter mittels eines schnellen Skalpellschnittes eröffnet. Das Blut wurde in Serumröhrchen mit Granulat als Zentrifugierhilfe aufgefangen. Sofort danach wurde das Küken mittels Genickschlag getötet. Das gewonnene Blut wurde nach vollständiger Gerinnung 10 min. bei 1200 g zentrifugiert. Das Serum wurde in spitze Plastikröhrchen umgeschüttet und für die Bestimmung der Alkalischen Phosphatase 0,2 ml abpipettiert. Serumproben und Alkalische Phosphataseproben wurden bei minus 18 °C eingefroren.

4. Serumcalciumbestimmung:

Nach Verdünnung der Proben mit 5 % Lithiumchloridlösung mittels Dual Diluter wurde die Calciumbestimmung mit einem Eppendorf Flammenphotometer durchgeführt.

5. Alkalische Phosphatase:

Die Alkalische Phosphatase wurde aus dem Pool einer jeden Gruppe mit Hilfe eines Testkits der Firma SIGMA, chemical company, technical bulletin No. 246 bestimmt.

6. Knochenaschebestimmung:

Zur Analyse wurde die Tibia des rechten Beines verwendet.

Hierfür wurde das Bein in Höhe der Femurdiaphyse abgetrennt. Die Beine jeder Gruppe wurden gesammelt und gekennzeichnet. Bis zur entgeltigen Aufarbeitung wurden die Beine bei -18°C eingefroren.

Zur Aschebestimmung wurden die Beine gekocht. Nach 20 Minuten Kochzeit konnten die Weichteile leicht entfernt werden. Es wurde streng darauf geachtet, daß die Epiphysen an der Tibia belassen wurden, da sie sich in diesem Stadium sehr leicht ablösen. Die Knochen wurden bei 100°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und anschließend gewogen. Es folgte die Veraschung im Muffelofen bei 600°C . Nach dem Abkühlen im Exsikkator wurde das Aschegewicht festgestellt. Aus dem absoluten Aschegewicht und dem Knochentrockengewicht wurde die prozentuale Knochenasche errechnet, um bei unterschiedlicher Knochengröße den Grad der Mineralisierung angeben zu können.

7. Bestimmung des CaBP (Calcium-Binding-Protein):

Das intestinale CaBP stellt die direkte Antwort auf das Steroid-Hormon $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ dar und steht nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Calciumaufnahme.

a) Herstellen des Schleimhauthomogenats:

Die Aufbereitung des Dünndarms erfolgte nach der Methode von CORRADINO und WASSERMAN (1971). Sofort nach der Tötung wurde dem Kuku der absteigende Ast des Duodenums entnommen, in eiskühler, physiologischer Kochsalzlösung gespült und entlang des Gekröseansatzes geöffnet. Um den noch

verbleibenden Rest des Nahrungsbreis zu entfernen wurde nochmals sorgfältig gespült und mit einem Objektträger die Mucosa vorsichtig abgeschabt. Die Mucosaprobe wurde gewogen, mit der 6-fachen Menge an eisgekühlter Trispufferlösung (0,2 molar, pH 7,4) verdünnt und mit einem Potter-Elektrigin-Homogenisator mit Teflonpißstill homogenisiert.

Die so vorbereitete Mucosa wurde in einer Sigma-Zentrifuge 20 min. bei 38 000 g und 3 °C zentrifugiert.

Der Überstand wurde in Plastikröhrchen umgeschüttet und im Wasserbad bei 60 °C 12 min. erhitzt. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 1 200 g, 10 min.

Im verbleibenden, milchig bis klaren Überstand befinden sich nur noch hitzestabile Proteine, unter anderem auch das CaBP. Die so erhaltenen Proben wurden bis zum nächsten Tag im Kühlschrank aufbewahrt. Zur Quantitätsbestimmung des CaBP's wird die Calciumbindungsfähigkeit ausgenutzt. Das Prinzip besteht darin, durch Zugabe einer definierten Menge eines Kationenaustauscherharzes (Chelex 100, Bio Rad Laboratories, 200-400 mesh) eine Konkurrenzsituation für Calcium zu schaffen zwischen Chelex (bekannte Mengen) und CaBP (unbekannte Menge).

In Plastikröhrchen wurden je 0,5 ml einer Chelex-Trispuffer-Suspension (4,5 g Chelex auf 25 ml Trispuffer) vorgelegt. Dazu wurden je 1,0 ml Schleimhauthomogenat gegeben. Nach kurzem Vermischen auf einem Vortex-Gerät wurde in jedes Röhrchen 0,1 ml $^{45}\text{CaCl}$ -Lösung (Amersham, 1mCi/200 ml Trispuffer) gegeben und genau 15 sec. auf dem Vortex-Gerät vermischt.

Durch Zentrifugieren (10 min. bei 1 600 g) wurde das an Chelex gebundene ^{45}Ca abgetrennt. Vom Überstand, der das an CaBP gebundene ^{45}Ca enthält, wurden je 0,2 ml zu 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Unisolve I, Zinser) in Zählfläschchen gegeben und vermischt. Mit dem β -Szintillationszähler (Flüssigkeitsszintillationszähler Packard TR/CARB, Mod. 33 85) wurde die Radioaktivitätsmenge in Bezug

auf einen Standard bestimmt. Durch die Messung der Gesamtradioaktivität (= Standard: 0,1 ml $^{45}\text{CaCl}$ -Lösung + 0,1 ml Aqua dest + 10 ml Szintillationsflüssigkeit) kann das CaBP in Prozent Radioaktivität der Probe, bezogen auf die Gesamtradioaktivität, angegeben werden.

Durch Multiplikation mit dem Faktor 8 erhält man die Korrektur auf 1 ml Schleimhauthomogenat. Dividiert man den Wert durch das Gesamtprotein (mg/ml Schleimhauthomogenat), so erhält man radioaktiv markiertes CaBP in Prozent bezogen auf die Gesamtradioaktivität pro Milliliter Schleimhauthomogenat pro Milligramm Gesamtprotein.

Die Korrektur auf Gesamtprotein erhöht die Genauigkeit des Ergebnisses, da beim Abschaben der Schleimhaut unterschiedliche Mengen von Mucosa gewonnen werden.

8. Bestimmung des Gesamtproteins:

Die Bestimmung wurde mit einem Technicon-Autoanalyser Typ I (Tarrytown, USA) nach Arbeitsanleitung durchgeführt.

Tabelle 1

Vitamin D-freies Alleinfutter (halbsynthetisch)

(1,2 % Ca / 0,7 % P)

Komponenten	Prozent
Purina (710 K)	22,00
Hefe (40% Protein)	2,00
L-Methionin	0,30
Glycin	0,30
Maiskleber	33,30
Dextrose (Ceruleose)	28,00
Sojaöl	4,90
Cholinchlorid	0,15
<u>Futterzusätze</u>	
Mineralstoffe	5,35
Spurenelemente	2,00
Vitamine	2,00
Gesamt	100

Tabelle 2

Futterzusätze

a) Mineralstoffe

Komponenten	Prozent
Ca CO ₃	28,0
Ca HPO ₄	37,5
KH ₂ PO ₄	20,5
Na Cl	7,5
Mg SO ₄ (x7 H ₂ O)	6,5
Gesamt	100

b) Spurenelemente

Komponenten	Prozent
Fe(II)-Gluconat x2 H ₂ O	3,5000
Mn SO ₄ x H ₂ O	0,8500
Zn O	0,3250
Cu SO ₄ x 5 H ₂ O	0,1000
Na Mo O ₄ x 2 H ₂ O	0,0250
KJ	0,0035
Co Cl ₂ x 6 H ₂ O	0,0075
Na ₂ Se O ₃ x 5 H ₂ O	0,0025
Sojafleinmehl	95,1900
Gesamt	100

Tabelle 3

Futterzusätze

c) Vitamine

Komponenten	Prozent
Retinol (Vit. A)	0,0075
Thiamin (Vit. B ₁)	0,0100
Nicotinsäure (Vit. B ₂)	0,2000
Ca-Pantothenat (Vit. B ₂)	0,0600
Riboflavin (Vit. B ₂)	0,0200
Pyridoxin (Vit. B ₆)	0,0100
Cyanocobalamin (Vit. B ₁₂)	0,0001
D,L-Tocopherol (Vit. E)	0,6000
Vitamin K ₃	0,0050
Sojafleinmehl	99,0900
Gesamt	100

4. Ergebnisse

4.1 Versuch I:

In diesem Versuch wurde die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in drei verschiedenen Konzentrationen untersucht. Daneben wurde der Metabolit $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ in zwei Konzentrationen allein und in Kombination mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ getestet. Auch $25(\text{OH})\text{D}_3$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ wurden allein und in Kombinationen verabreicht.

1. Futtermverzehr:

Der Futtermverzehr überstieg bei allen Gruppen, außer bei D_3 die negative Kontrolle nicht oder nur unwesentlich. Bei keiner der Kombinationsgruppen war eine Wirkungsverstärkung festzustellen.

2. Gewichtszunahme:

Bei den Gruppen, die verschieden hohe Konzentrationen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ erhielten, war eine dosisabhängige Wirkungssteigerung festzustellen.

$2,5 \mu\text{g } 1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ und $0,5 \mu\text{g } 1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ zeigten gegenüber der negativen Kontrolle keine Steigerung.

Bei den Kombinationsgruppen mit $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ konnte bis auf Gruppe 11 überall ein synergistischer Effekt festgestellt werden, der jedoch nur bei der Kombination $0,25 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $5 \mu\text{g } 1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ signifikant war ($p = 0,001$).

Auch die Kombination $0,25 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $1 \mu\text{g } 25(\text{OH})\text{D}_3$ zeigte überadditive Wirkung ($p = 0,01$).

3. CaBP:

Die positive Kontrolle lag deutlich höher als die negative Kontrolle, dagegen zeigten die einzelnen Gruppen, wohl aufgrund der niedrigen Dosierung der Metaboliten keine wesentliche Steigerung des CaBP's. Es ist jedoch trotzdem ein Wirkungsanstieg festzustellen, wenn man die Dosis von 1,25 (OH)₂D₃ von 0,25 µg auf 0,5 µg bzw. auf 1 µg pro kg Futter erhöht. Ähnliches gilt für 1,25,26(OH)₂D₃. Bei den Kombinationen zeigt sich zum Teil ein synergistischer Effekt, und zwar am stärksten in der Dosierung von 0,25 µg 1,25(OH)₂D₃ und 2,5 µg 1,25,26(OH)₂D₃ (p = 0,001).

Die Kombination von 0,5 µg 1α(OH)D₃ und 2,5 µg 1,25,26(OH)₂D₃ blieb ohne Wirkung auf das intestinale CaBP.

4. Serum-Calcium:

Bei allen Gruppen zeigt der Serum-Calcium-Gehalt nur geringe Schwankungen. Den höchsten Serum-Calcium-Spiegel wiesen die positive Kontrolle und die Kombinationsgruppe 0,5 µg 1,25(OH)₂D₃ und 2,5 µg 1,25,26(OH)₂D₃ auf. Diese Kombination wies einen synergistischen Effekt auf (p = 0,01). Die Kombinationen lagen über der Wirkung der Einzelsubstanzen. Da aber die Höhe der positiven Kontrolle erreicht wurde, war mit überadditiven Effekten nicht zu rechnen.

Der Wert 6,1 mg Ca / 100 ml Serum von Gruppe 3 liegt über der Dosis-Wirkungsgeraden. Ein Wert von 5,3 mg Ca / 100 ml Serum hätte auf der Geraden gelegen. Würde man diesen Wert berücksichtigen, so hätten die Kombinationen 0,25 µg 1,25(OH)₂D₃ mit 2,5 µg und 5 µg 1,25,26(OH)₂D₃ einen Synergismus aufgewiesen.

5. Knochenasche, absolute und relative:

Die Knochenasche zeigte eine dosisabhängige Steigerung bei den einzelnen verabreichten $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Dosen wie auch bei den beiden $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ Gruppen. Die höchsten Gehalte an Knochenasche wurden, außer bei der positiven Kontrolle, bei der Kombination von $0,25 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $5 \mu\text{g } 1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ sowie auch bei der Einzelverabreichung von $1 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gemessen.

Ein synergistischer Effekt konnte (sowohl absolut als auch relativ) bei der Kombinationsgruppe $0,5 \mu\text{g } 1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ mit $2,5 \mu\text{g } 1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ gemessen werden. Der absolute und relative Knochenaschegehalt der Einzelverabreichung von $0,25 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ liegen über der Dosis-Wirkungsgeraden dieses Versuchs. Würde man den auf der Gerade liegenden Wert betrachten, so würde sich für Gruppe 10 und 13 sowohl bei der absoluten als auch bei der relativen Knochenasche ein Synergismus zeigen.

6. Erniedrigung der AP-Aktivität im Serum:

Je höher die gewählte Dosis von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, desto mehr erniedrigte sich die Aktivität der AP im Serum gegenüber der Vitamin D-freien Kontrolle. Beide $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ -Gruppen zeigten ähnliche Werte für die Alkalische Phosphatase.

Die Kombinationsgruppen verhielten sich unterschiedlich:

Während in der niedrigsten $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ -Dosierung ($0,25 \mu\text{g} + 2,5 \mu\text{g}$) keine Erniedrigung der AP-Werte gegenüber der negativen Kontrolle auftrat, zeigten die übrigen 3 Kombinationen mit $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ rein additive Effekte. Ein Synergismus konnte in der Kombination $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $25(\text{OH})\text{D}_3$ ($0,25 \mu\text{g} + 1,0 \mu\text{g}$) gemessen werden.

Tabelle 4

Versuch I: Futterverzehr

Diät	Futterverzehr in g/Tier/Tg
1 D-freie Kontrolle	22,9
2 8 µg D ₃	30,8
3 0,25 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	22,1
4 0,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	23,3
5 1,0 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	23,1
6 2,5µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	19,6
7 5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	22,6
8 1,0µg 25(OH)D ₃	21,5
9 0,5µg 1α(OH)D ₃	25,3
10 0,25µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 2,5µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	21,5
11 0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 2,5µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	22,9
12 0,25µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	23,7
13 0,25µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 1,0µg 25(OH)D ₃	22,6
14 0,5µg 1α(OH)D ₃ + 2,5µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	22,5

Tabelle 5

Versuch I: Gewichtszunahme

	Diät	x	+ s
1	D-freie Kontrolle	219	54
2	8 µg D ₃	332	64
3	0,25 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	226	42
4	0,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	266	37
5	1,0 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	281	54
6	2,5µg 1,25,26(OH) ₃ D ₃	204	35
7	5,0µg 1,25,26(OH) ₃ D ₃	260	24
8	1,0µg 25(OH)D ₃	220	37
9	0,5µg 1α(OH)D ₃	214	40
10	0,25µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 2,5µg 1,25,26(OH) ₃ D ₃	230	36
11	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 2,5µg 1,25,26(OH) ₃ D ₃	239	42
12	0,25µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 1,25,26(OH) ₃ D ₃	286	40
13	0,25µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 1,0µg 25(OH)D ₃	259	32
14	0,5µg 1α(OH)D ₃ + 2,5µg 1,25,26(OH) ₃ D ₃	250	37

Tabelle 6

Versuch I: CaBP

	Diat	x	+ s
1	D-freie Kontrolle	1,45	0,6
2	8 µg D ₃	4,83	1,0
3	0,25 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	1,38	0,2
4	0,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	1,54	0,6
5	1,0 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	1,92	0,7
6	2,5 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	1,14	0,4
7	5,0 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	1,57	0,4
8	1,0 µg 25(OH)D ₃	1,50	0,2
9	0,5 µg 1α(OH)D ₃	1,55	0,3
10	0,25 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 2,5 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	1,84	0,3
11	0,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 2,5 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	1,62	0,2
12	0,25 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	1,59	0,5
13	0,25 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 1,0 µg 25(OH)D ₃	1,75	0,4
14	0,5 µg 1α(OH)D ₃ + 2,5 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	1,20	0,3

Tabelle 7

Versuch I: Serumcalcium

	Diät	mg/100ml Serum	x	± s
1	D-freie Kontrolle		4,9	1,0
2	8 µg D ₃		6,2	0,9
3	0,25 µg 1,25(OH) ₂ D ₃		6,1	0,9
4	0,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₃		5,8	0,8
5	1,0 µg 1,25(OH) ₂ D ₃		6,2	0,7
6	2,5 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃		5,3	0,6
7	5,0 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃		4,9	0,5
8	1,0 µg 25(OH)D ₃		5,9	1,1
9	0,5 µg 1α(OH)D ₃		5,8	1,0
10	0,25 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 2,5 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃		6,1	0,9
11	0,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 2,5 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃		6,9	1,2
12	0,25 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃		6,0	0,6
13	0,25 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 1,0 µg 25(OH)D ₃		6,0	1,1
14	0,5 µg 1α(OH)D ₃ + 2,5 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃		6,0	1,0

Tabelle 8

Diät		in g	%
1	D-freie Kontrolle	0,226	24,6
2	8 µg D ₃	0,465	37,1
3	0,25 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,270	27,4
4	0,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,283	26,7
5	1,0 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,313	28,6
6	2,5 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	0,227	22,6
7	5,0 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	0,280	27,5
8	1,0 µg 25(OH)D ₃	0,235	26,6
9	0,5 µg 1α(OH)D ₃	0,231	23,6
10	0,25 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 2,5 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	0,252	26,4
11	0,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 2,5 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	0,287	26,0
12	0,25 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	0,297	25,9
13	0,25 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 1,0 µg 25(OH)D ₃	0,285	28,2
14	0,5 µg 1α(OH)D ₃ + 2,5 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	0,280	28,6

Tabelle 9

Versuch I: Alkalische Phosphatase

	Diät	U/l
1	D-freie Kontrolle	23.399
2	8 µg D ₂₅	10.136
3	0,25 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	21.396
4	0,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	18.695
5	1,0 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	15.386
6	2,5 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	20.060
7	5,0 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	22.640
8	1,0 µg 25(OH)D ₃	24.157
9	0,5 µg 1α(OH)D ₃	22.367
10	0,25 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 2,5 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	23.945
11	0,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 2,5 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	15.447
12	0,25 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	20.546
13	0,25 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 1,0 µg 25(OH)D ₃	18.330
14	0,5 µg 1α(OH)D ₃ + 2,5 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	19.757

4.2 Versuch II:

Nachdem sich im ersten Versuch zum Teil ein synergistischer Effekt bei Kombinationen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit dem Metaboliten $1,25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ angedeutet hatte, wurde in diesem Versuch $1,25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ erneut eingesetzt. Es wurde jedoch statt der sehr niedrigen Dosis von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($0,25 \mu\text{g}$) aus Versuch I eine höhere Dosis gewählt ($0,5 \mu\text{g}$ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$). Außerdem wurde der Metabolit $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ allein und in Kombination mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ getestet. In diesem Versuch konnte CaBP nicht pro Milligramm Gesamtprotein angegeben werden, da es bei der Aufbereitung des Gesamtproteins zu Ausfällungen gekommen war. Es wird deshalb der unkorrigierte Wert als CaBP % Rad. angegeben. Dieser Wert bezeichnet die Radioaktivität der Probe in Bezug zum Standard und wird vom β -Szintillationszähler ausgedruckt. Da nur der Unterschied zwischen einzelnen Versuchsgruppen wichtig ist, spielt der absolute Wert keine Rolle. Die Korrektur auf Gesamtprotein verschiebt die Relation nicht, wie sich bei Vergleichen mit anderen Versuchen später zeigte.

1. Futterverzehr:

Der Verbrauch an Futter war bei allen Gruppen höher als bei der negativen Kontrolle.

Es zeigte sich eine dosisabhängige Steigerung des Futterverzehrs bei der Steigerung von $0,5 \mu\text{g}$ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf $1,0 \mu\text{g}$ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und bei der Dosiserhöhung von $5 \mu\text{g}$ $1,25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf $15 \mu\text{g}$ $1,25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$. Bei der Einzelverabreichung von $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ je $5,0 \mu\text{g}$ bzw. $15,0 \mu\text{g}$ lag der Futterverzehr insgesamt niedriger, es wurde jedoch eine Steigerung des Futterverzehrs gegenüber der negativen Kontrolle um fast das Doppelte festgestellt.

Bei den Kombinationen war der Futterverzehr bei den Gruppen

mit 1,25,26(OH) $_2$ D $_3$ am höchsten. Hier wurden ähnliche Werte wie bei der positiven Kontrolle (8 μ g D $_3$) erreicht. Nicht ganz so hoch lagen die beiden Kombinationen mit 25,26(OH) $_2$ D $_3$, die lediglich 55% bzw. 70% der negativen Kontrolle erreichten, was einem additiven Effekt entspricht.

2. Gewichtszunahme:

Bei allen Gruppen lag die Gewichtszunahme über der negativen Kontrolle. Auch hier zeigte sich eine dosisabhängige Steigerung bei der Einzelverabreichung von 1,25(OH) $_2$ D $_3$ und 1,25,26(OH) $_2$ D $_3$. Die beiden 25,26(OH) $_2$ D $_3$ Gruppen waren unter Berücksichtigung der Streuung nicht verschieden. Die Kombinationen 0,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ mit 5 μ g 1,25,26(OH) $_2$ D $_3$ erreichte 80 % des Wertes der positiven Kontrolle. Es konnte ein synergistischer Effekt festgestellt werden ($p = 0,001$). Da bei der Kombination 0,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ mit 15 μ g 1,25,26(OH) $_2$ D $_3$ bereits die maximale Gewichtszunahme (wie bei der positiven Kontrolle mit 8 μ g D $_3$) erreicht war, konnte kein synergistischer Effekt mehr erwartet werden. Deutlich niedriger war der Effekt von 5 μ g bzw. 15 μ g 25,26(OH) $_2$ D $_3$. Die beiden Gruppen waren nicht signifikant verschieden. Unklar ist, warum der Wert für die Gruppe 5 μ g 25,26(OH) $_2$ D $_3$ so hoch liegt. Alle anderen Parameter dieser Gruppe liegen unter den für 15 μ g 25,26(OH) $_2$ D $_3$ gemessenen Werten.

3. CaBP % Rad.:

Gegenüber der negativen Kontrolle zeigte sich bei allen Gruppen eine leichte Steigerung des CaBP. Diese Steigerung war dosisabhängig und linear für alle Metaboliten. Bei der Kombination 0,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ mit 5,0 μ g 1,25,26(OH) $_2$ D $_3$ konnte ein Synergismus festgestellt werden ($p = 0,005$). Auch bei Erhöhung der 1,25,26(OH) $_2$ D $_3$ Dosis auf 15,0 μ g war ein

synergistischer Effekt festzustellen ($p = 0,001$).
25,26(OH) $_2$ D $_3$ zeigte sich auch beim CaBP als weniger wirksam
als 1,25,26(OH) $_3$ D $_3$.

4. Serumcalcium:

Die Gabe von 0,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ erwies sich als zu niedrig,
um das Serumcalcium über den Wert der negativen Kontrolle
anzuheben. Auch bei den beiden Gruppen mit Einzel
verabreichung von 1,25,26(OH) $_2$ D $_3$ (5,0 μ g bzw. 15,0 μ g)
konnte kein Anstieg des Serumcalciums über die negative
Kontrolle festgestellt werden. Die beiden
Kombinationsgruppen von 0,5 μ g und 1,25(OH) $_2$ D $_3$ mit 5,0 μ g
1,25,26(OH) $_3$ D $_3$ bzw. 15,0 μ g 1,25,26(OH) $_3$ D $_3$ wiesen einen
synergistischen Effekt auf (beide Gruppen $p = 0,001$), der
die rein additiv zu erwartende Wirkung überstieg. Wenig
Wirkung zeigten die beiden Kombinationen von 0,5 μ g
1,25(OH) $_2$ D $_3$ mit 5,0 μ g bzw. 15,0 μ g 1,25,26(OH) $_3$ D $_3$, wo erst
bei 15,0 μ g 1,25,26(OH) $_3$ D $_3$ ein Wert wie bei 1,0 μ g
1,25(OH) $_2$ D $_3$ erreicht werden konnte.

5. Knochenasche, absolute und relativ:

Alle verabreichten Metaboliten zeigten eine Steigerung des
Knochenaschegewichts und des Mineralisationsgrades. Die
Wirkung von 1,25,26(OH) $_3$ D $_3$ war auch hier stärker als die von
25,26(OH) $_2$ D $_3$. Die Kombination von 0,5 μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ mit 5
 μ g 1,25,26(OH) $_3$ D $_3$ zeigte sowohl beim Knochenaschegewicht als
auch beim prozentualen Wert (Mineralisationsgrad) einen
überadditiven Effekt. Eine Erhöhung der Dosis von
1,25,26(OH) $_3$ D $_3$ auf 15,0 μ g zeigte diesen Effekt nicht mehr,
da die erhaltenen Werte bereits über der positiven Kontrolle
lagen. Eine additive oder sogar überadditive Wirkung konnte
also gar nicht mehr erwartet werden.

5. Erniedrigung der AP-Aktivität im Serum:

Je höher die Konzentration der einzelnen Metaboliten, um so stärker erniedrigte sich die AP im Serum gegenüber der negativen Kontrolle. Lediglich bei den Gruppen mit $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ konnte dies nicht nachvollzogen werden, da die Konzentration von $15,0 \mu\text{g } 25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ gegenüber der negativen Kontrolle keine Erniedrigung der AP brachte. Die Kombination von $0,5 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $5 \mu\text{g } 1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ hatte wenig Wirkung, bei der Erhöhung der $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ -Dosis auf $15,0 \mu\text{g}$ jedoch zeigte sich eine überadditive Erniedrigung der Alkalischen Phosphatase.

Tabelle 10

Versuch II: Futterverzehr

Diät	Futterverzehr in g/Tier/Tag
1 D-freie Kontrolle	16,3
2 8µg D ₃	30,0
3 0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	19,7
4 1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	26,3
5 5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	23,3
6 15,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	27,7
7 5,0µg 25,26(OH) ₂ D ₃	19,7
8 15,0µg 25,26(OH) ₂ D ₃	22,7
9 0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	28,3
10 0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 15,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	30,2
11 0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 25,26(OH) ₂ D ₃	23,7
12 0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 15,0µg 25,26(OH) ₂ D ₃	26,0

Tabelle 11

Versuch II: Gewichtszunahme

	Diät	x	± s
1	D-freie Kontrolle	161	24
2	8µg D ₃	417	51
3	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	262	47
4	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	365	29
5	5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	254	40
6	15,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	378	63
7	5,0µg 25,26(OH) ₂ D ₃	260	47
8	15,0µg 25,26 (OH) ₂ D ₃	244	54
9	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	371	61
10	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 15,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	410	43
11	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 25,26(OH) ₂ D ₃	297	85
12	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 15,0µg 25,26(OH) ₂ D ₃	337	43

Tabelle 12

Versuch II: CaBP % Radioaktivität

Diät		x	+ s
1	D-freie Kontrolle	1,04	0,3
2	8µg D ₃	5,06	0,6
3	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	1,48	0,4
4	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	1,99	0,5
5	5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	1,63	0,4
6	15,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	3,22	0,7
7	5,0µg 25,26(OH) ₂ D ₃	1,63	0,5
8	15,0µg 25,26 (OH) ₂ D ₃	1,86	0,2
9	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	2,72	0,9
10	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 15,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	4,51	0,7
11	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 25,26(OH) ₂ D ₃	2,36	0,4
12	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 15,0µg 25,26(OH) ₂ D ₃	2,13	0,6

Tabelle 13

Versuch II: Serumcalcium

1	D-freie Kontrolle	5,9	0,2
2	8µg D ₃	8,2	0,8
3	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	6,2	1,2
4	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	7,0	0,8
5	5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	7,2	1,2
6	15,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	8,8	1,0
7	5,0µg 25,26(OH) ₂ D ₃	6,7	1,2
8	15,0µg 25,26(OH) ₂ D ₃	6,2	0,6
9	0,5µg 1,25(OH)D + 5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	8,0	1,1
10	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 15,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	9,5	0,4
11	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 25,26(OH) ₂ D ₃	6,4	1,4
12	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 15,0µg 25,26(OH) ₂ D ₃	7,2	1,0

Tabelle 14

Versuch II: Absoluter und relativer Knochenaschegehalt

	Diät	g	%
1	D-freie Kontrolle	0,199	22,9
2	8µg D ₃	0,633	33,5
3	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,315	25,8
4	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,509	30,3
5	5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	0,330	25,8
6	15,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	0,586	35,0
7	5,0µg 25,26(OH) ₂ D ₃	0,294	24,2
8	15,0µg 25,26(OH) ₂ D ₃	0,365	26,7
9	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	0,476	30,9
10	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 15,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	0,683	35,4
11	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 25,26(OH) ₂ D ₃	0,368	27,1
12	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 15,0µg 25,26(OH) ₂ D ₃	0,407	28,3

Tabelle 15

Versuch II: Alkalische Phosphatase

	Diät	U/l
1	D-freie Kontrolle	23.615
2	8µg D ₃	10.589
3	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	21.633
4	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	14.296
5	5,0µg 1,25,26(OH) ₃ D ₃	17.220
6	15,0µg 1,25,26(OH) ₃ D ₃	14.245
7	5,0µg 25,26(OH) ₂ D ₃	17.473
8	15,0µg 25,26 (OH) ₂ D ₃	25.339
9	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 1,25,26(OH) ₃ D ₃	19.137
10	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 15,0µg 1,25,26(OH) ₃ D ₃	6.026
11	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 25,26(OH) ₂ D ₃	15.783
12	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 15,0µg 25,26(OH) ₂ D ₃	16.641

4.3 Versuch III

Zu diesem Versuch sollte die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in Kombination mit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ getestet werden. Ferner wurde die Wirkung einer Kombination aus drei Metaboliten untersucht. Außerdem wurde nochmals eine Kombinationsgruppe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ gebildet, nachdem sich beim vorangehenden Versuch $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ dem $25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ überlegen gezeigt hatte. Neben dem in vivo vorkommenden $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurden auch Kombinationen mit dem synthetischen Analogon $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ untersucht.

1. Futterverzehr:

Die Steigerung der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Dosis von $0,5 \mu\text{g}$ auf $1,0 \mu\text{g}$ brachte eine Verdoppelung der auf negative Kontrolle korrigierten Werte. Das bedeutet, daß sich auch hier die Dosis-Wirkungskurve in einem linearen Bereich befindet. Durch $0,5 \mu\text{g}$ $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und durch $5,0 \mu\text{g}$ $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ war keine Steigerung des Futterverzehrs gegenüber der negativen Kontrolle zu bewirken. Ähnliches gilt für die Gruppe mit $1,0 \mu\text{g}$ $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$, während $1,0 \mu\text{g}$ $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ in Kombination mit $5,0 \mu\text{g}$ $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und mit $0,5 \mu\text{g}$ $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ einen überadditiven Effekt aufwies.

2. Gewichtszunahme:

Die Verdoppelung der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Dosis ließ auch die Gewichtszunahmen auf das Doppelte ansteigen. Nur bei der Kombination $0,5 \mu\text{g}$ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $0,5 \mu\text{g}$ $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ war ein synergistischer Effekt zu beobachten, der jedoch nicht signifikant war. Bei den übrigen Gruppen konnte mit der kombinierten Verabreichung von Vitamin D-Metaboliten kein

Überadditiver Effekt erzielt werden. Die Kombinationsgruppen lagen jedoch alle über den Werten der Einzelsubstanzen der entsprechenden Konzentration, ihre Wirkung blieb jedoch unteradditiv.

3. CaBP:

Bei diesem Versuch zeigte der Parameter CaBP nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Zwar liegt die positive Kontrolle (8 µg D_3) ca. doppelt so hoch wie die negative Kontrolle, doch war bei Steigerung der $1,25(OH)_2D_3$ -Dosis von 0,5 µg auf 1,0 µg nur ein sehr geringer Anstieg des CaBP nachzuweisen. Trotzdem zeigte sich in der Kombinationsgruppe 0,5 µg $1,25(OH)_2D_3$ mit 5,0 µg $1,25,26(OH)_3D_3$ ein synergistischer Effekt ($p = 0,005$).

4. Serumcalcium:

Den stärksten Anstieg des Serumcalciums erbrachte die positive Kontrolle, gefolgt von der Gruppe mit 1,0 µg $1,25(OH)_2D_3$. Bei den Kombinationsgruppen konnte der höchste Serumcalciumspiegel bei der Gruppe mit 0,5 µg $1,25(OH)_2D_3$ kombiniert mit 0,5 µg $1,24,25(OH)_3D_3$ gemessen werden. Hier zeigte sich ein deutlicher Überadditiver Effekt ($p = 0,01$). Die Kombination erreichte 125 % des rein additiven Wertes. Die Dreierkombination wies einen niedrigen Serumcalciumspiegel auf, ebenso die Kombination von 0,5 µg $1,25(OH)_2D_3$ mit 5,0 µg $1,24,25(OH)_3D_3$ und die Kombination von 1,0 µg $1\alpha(OH)D_3$ mit 5,0 µg $24,25(OH)_2D_3$. Alle drei Kombinationen zeigen korrespondierend dazu einen hohen Knochenascheanteil, der zum Teil deutlich synergistisch ist. Hier dürfte die Einlagerung von Calcium in den Knochen für die niedrigen Calciumspiegel im Serum verantwortlich sein.

5. Knochenasche, absolut und relativ:

Alle Gruppen lagen mit ihrem Knochenascheanteil über der negativen Kontrolle, wobei die Kombinationen durchweg höhere Werte aufwiesen, als die jeweiligen Einzelsubstanzen. Den höchsten Ascheanteil, sowohl absolut als auch prozentual zeigten die Kombinationen 0,5 µg 1,25(OH)₂D₃ mit 5 µg 1,25,26(OH)₂D₃ und 1,0 µg 1α(OH)D₃ mit 5,0 µg 24,25(OH)₂D₃. Bei beiden Kombinationen war ein Synergismus festzustellen. Die Kombinationen 0,5 µg 1,25(OH)₂D₃ mit 5,0 µg 24,25(OH)₂D₃ zeigten bezüglich des Knochenaschegewichtes einen rein additiven, bezüglich des prozentualen Ascheanteils aber einen synergistischen Effekt. Sehr hoch lagen auch der absolute und der relative Knochenaschegehalt der Dreierkombination, es waren aber nur additive Wirkungen zu erkennen.

6. Erniedrigung der AP im Serum:

Die stärkste Senkung der AP gegenüber der negativen Kontrolle war durch 8 µg D₃ (=positive Kontrolle) möglich. Während 0,5 µg 1,25(OH)₂D₃ die AP kaum beeinflusste, konnte durch 1,0 µg 1,25(OH)₂D₃ 60 % der Wirkung von 8 µg D₃ erreicht werden. Noch stärker dämpfenden Einfluß auf die AP-Aktivität hatten 0,5 µg 1,24,25(OH)₂D₃ und 5,0 µg 24,25(OH)₂D₃. Bei der Dreierkombination konnte nur eine sehr geringe Erniedrigung erzielt werden, und in den beiden Kombinationen mit 1α(OH)D₃ wurden gleiche Werte gemessen wie mit 1α(OH)D₃ allein.

Tabelle 16

Versuch III: Futterverzehr

	Diät	Futterverzehr g/Tier/Tag
1	D-freie Kontrolle	29,0
2	8µg D ₃	37,8
3	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	33,1
4	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	36,6
5	5,0µg 24,25,26(OH) ₃ D ₃	30,6
6	0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	29,5
7	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	33,7
8	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	32,6
9	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃ + + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	33,6
10	5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	32,8
11	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	33,3
12	1,0µg 1α(OH)D ₃	30,7
13	1,0µg 1α(OH)D ₃ + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	36,1
14	1,0µg 1α(OH)D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	32,4

Tabelle 17

Versuch III: Gewichtszunahme

	Diät	x	+ s
1	D-freie Kontrolle	214	30
2	8µg D ₃	413	72
3	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	287	58
4	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	382	49
5	5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	299	44
6	0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	227	35
7	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	308	70
8	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	311	45
9	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃ + + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	344	48
10	5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	286	48
11	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	340	59
12	1,0µg 1α(OH)D ₃	302	39
13	1,0µg 1α(OH)D ₃ + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	333	47
14	1,0µg 1α(OH)D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	290	74

Tabelle 18

Versuch III: CaBP

Diät	x	+ s
1 D-freie Kontrolle	4,32	1,0
2 8µg D ₃	8,53	1,4
3 0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	4,16	0,7
4 1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	4,49	0,8
5 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	3,89	0,6
6 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	3,56	0,5
7 0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	4,16	1,0
8 0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	3,55	0,5
9 0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃ + + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	3,90	1,0
10 5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	3,95	0,8
11 0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	4,56	1,6
12 1,0µg 1α(OH)D ₃	3,18	0,7
13 1,0µg 1α(OH)D ₃ + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	4,43	1,0
14 1,0µg 1α(OH)D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	2,90	0,8

Tabelle 19

Versuch III: Serumcalcium

	Diät	mg/100ml	x	+ s
1	D-freie Kontrolle		5,7	0,8
2	8µg D ₃		8,3	1,0
3	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃		6,6	0,9
4	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃		7,8	1,2
5	5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃		7,2	1,2
6	0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃		6,3	1,0
7	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃		6,9	0,8
8	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃		7,6	0,9
9	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃ + + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃		7,0	0,8
10	5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃		6,8	0,7
11	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃		7,5	0,9
12	1,0µg 1α(OH)D ₃		6,8	1,0
13	1,0µg 1α(OH)D ₃ + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃		7,2	0,9
14	1,0µg 1α(OH)D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃		7,5	1,0

Tabelle 20 Versuch III: Absoluter und relativer Knochenaschegehalt

	Diät	g	%
1	D-freie Kontrolle	0,236	22,9
2	8 µg D ₃	0,635	32,0
3	0,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,328	25,6
4	1,0 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,479	27,5
5	5,0 µg 24,25(OH) ₂ D ₃	0,290	23,9
6	0,5 µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	0,259	25,6
7	0,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0 µg 24,25(OH) ₂ D ₃	0,373	29,3
8	0,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5 µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	0,343	25,5
9	0,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5 µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃ + + 5,0 µg 24,25(OH) ₂ D ₃	0,377	29,9
10	5,0 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	0,297	24,9
11	0,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0 µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	0,404	29,4
12	1,0 µg 1α(OH)D ₃	0,335	28,7
13	1,0 µg 1α(OH)D ₃ + 5,0 µg 24,25(OH) ₂ D ₃	0,398	30,3
14	1,0 µg 1α(OH)D ₃ + 0,5 µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	0,336	28,0

Tabelle 21

Versuch III: Alkalische Phosphatase

	Diät	U/l
1	D-freie Kontrolle	23.184
2	8µg D ₃	8.728
3	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	22.915
4	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	14.187
5	5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	13.176
6	0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	12.603
7	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	12.940
8	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	17.051
9	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃ + + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	20.522
10	5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	10.952
11	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	17.927
12	1,0µg 1α(OH)D ₃	13.850
13	1,0µg 1α(OH)D ₃ + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	14.793
14	1,0µg 1α(OH)D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	13.850

4.4 Versuch IV

In diesem Versuch wurde die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei Zusatz von Vitamin C (100 ppm) untersucht. Dazu wurde eine Vitamin D-freie Kontrolle mit Vitamin C-Zusatz gebildet, sowie auch eine positive Kontrolle mit 8 μg Vitamin D_3 und 100 ppm Vitamin C. Eine Gruppe mit 0,5 μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurde mit Vitamin C-Zusatz versehen, eine Gruppe 0,5 μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ blieb ohne Vitamin C. Außerdem wurden wie im letzten Versuch Kombinationsgruppen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ gebildet, aber diesmal in anderen Konzentrationen.

Zur Kontrolle, ob unterschiedliche Standorte der Käfige (Außenwandkontakt, etc.) die Ergebnisse verfälschen, oder ob die Werte für die einzelnen Parameter vergleichbar sind, wurden drei Vergleichsgruppen gebildet (die Gruppen 5, 11 und 12 wurden durch die Gruppen 14, 15 und 16 wiederholt).

1. Futtermverzehr:

Es zeigte sich eine dosisabhängige Steigerung des Futtermverzehr bei allen drei Einzelkonzentrationen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,5 μg ; 1,0 μg ; 2,0 μg). Den höchsten Futtermverzehr zeigte die positive Kontrolle und die Gruppe mit 2,0 μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, gefolgt von den Kombinationen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ (0,5 μg + 1,0 μg , und 1,0 μg + 0,5 μg). Die Zugabe von 100 ppm Vitamin C zum Futter der Gruppe 4 und 10 bewirkte keine Steigerung des Futtermverzehr.

2. Gewichtszunahme:

Parallel zum Futtermverzehr steigt mit zunehmender Konzentration (0,5 μg ; 1,0 μg ; 2,0 μg) von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auch die Gewichtszunahme. Gleiches ist auch in den Gruppen mit

der Einzelverabreichung von $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ festzustellen. In den Gruppen 11 und 12, bei denen $0,5 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $0,5 \mu\text{g}$ bzw. $1,0 \mu\text{g } 1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kombiniert wurden, konnte ein additiver Effekt gemessen werden. Die Kombination von $1,0 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $1,5 \mu\text{g } 1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ergab einen überadditiven Effekt (nicht signifikant). Während die Gruppe mit $8 \mu\text{g D}_3$ leichter war als die Vergleichsgruppe mit $100 \text{ ppm Vitamin C-Zusatz}$, konnte bei der Verabreichung von $0,5 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zusammen mit $100 \text{ ppm Vitamin C}$ eine synergistische Wirkung gegenüber der alleinigen Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ beobachtet werden (nicht signifikant).

3. CaBP:

Das CaBP der Gruppen $0,5 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3 + 100 \text{ ppm Vitamin C}$ und $0,5 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3 + 0,5 \mu\text{g } 1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ konnte nicht bestimmt werden, da in Folge eines technischen Defekts in der Sigmazentrifuge die Proben bis zur Denaturierung erhitzt wurden.

Das höchste CaBP-Niveau erreichte die Gruppe mit $2 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Diese Gruppe übertraf noch die positive Kontrolle mit $8 \mu\text{g Vitamin D}_3$. Die Gruppe $8 \mu\text{g Vitamin D}_3 + 100 \text{ ppm Vitamin C}$ erreichte nicht ganz den Wert der Vergleichsgruppe ohne Vitamin C, doch liegen beide Werte etwa gleich hoch, wenn man die Streuung mit einbezieht.

4. Serumcalcium:

Den höchsten Calciumspiegel wiesen die Küken der Gruppe auf, die $2 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pro kg Futter erhalten hatten, sowie die positive Kontrolle ($8 \mu\text{g Vitamin D}_3$ mit und ohne Vitamin C-Zusatz). Die Gabe von $100 \text{ ppm Vitamin C}$ zu $0,5 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ war in der Lage, den Calciumspiegel über das Niveau der Vergleichsgruppe ohne Vitamin C, zu heben ($p = 0,05$). Die Kombinationen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zeigten

unteradditive bis additive Wirkungen auf den Calciumspiegel. Der Wert 7,6 mg Calcium / 100 ml Serum bei der Kombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($0,5 \mu\text{g} + 0,5 \mu\text{g}$) liegt wahrscheinlich zu hoch, verglichen mit dem Serumcalciumspiegel, den die Vergleichsgruppe (Gruppe 11) bei gleicher Dosis erreichte und verglichen mit den Werten, den die anderen Kombinationen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ in höherer Dosierung erreicht haben.

5. Knochenasche, absolut und relativ:

Den höchsten Knochenaschegehalt erreichte die positive Kontrolle ($8 \mu\text{g D}_3$), dicht gefolgt von der Gruppe mit $2,0 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Bei den Kombinationsgruppen zeigte sich sowohl bei $0,5 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit Vitamin C-Zusatz als auch bei den Kombinationen mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ein Überadditiver Effekt. Der Synergismus war beim Knochenaschegewicht sowohl absolut als auch prozentual vorhanden. Das Ergebnis konnte durch die Vergleichsgruppen 15 und 16 bestätigt werden. Obwohl der absolute Knochenascheanteil bei der Gruppe mit $8 \mu\text{g Vitamin D}_3 + 100\text{ppm Vitamin C}$ geringer war als bei der Vergleichsgruppe ohne Vitamin C, ist die prozentuale Knochenasche (Mineralisationsgrad) doch deutlich höher. Die beste Knochenmineralisation wies die Gruppe mit $2,0 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf, die 70% höher lag als die positive Kontrolle.

6. Alkalische Phosphatase:

Die stärkste Erniedrigung der Serumaktivität der Alkalischen Phosphatase konnte durch $8 \mu\text{g Vitamin D}_3$ pro kg Futter erreicht werden. Die negative Kontrolle lag überraschend niedrig. Vergleicht man den linearen und parallelen Kurvenverlauf von Versuch I, II und III mit dem Verlauf der Kurve von Versuch IV, so müßte der Wert der negativen Kontrolle bei ca. 23 000 I U/l liegen.

Tabella 22

Versuch IV: Futterverzehr

Diät	Futterverzehr g/Tier/Tag
1 D-freie Kontrolle	28
2 D-freie Kontrolle + 100ppm Vit.C	24
3 8µg D ₃	36
4 8µg D ₃ + 100ppm Vit.C	33
5 0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	30
6 1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	31
7 2,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	34
8 0,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	26
9 1,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	29
10 0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 100ppm Vit.C	28
11 0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	30
12 0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 1,0µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	33
13 1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	33
14 wie Gruppe 5	29
15 wie Gruppe 11	27
16 wie Gruppe 12	31

Tabelle 23

Versuch IV: Gewichtszunahme

	Diät	x	+ s
1	D-freie Kontrolle	273	44
2	D-freie Kontrolle + 100ppm Vit.C	206	58
3	8µg D ₃	423	51
4	8µg D ₃ + 100ppm Vit.C	330	64
5	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	300	60
6	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	315	75
7	2,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	363	78
8	0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	249	52
9	1,0µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	275	50
10	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 100ppm Vit.C	316	58
11	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	300	56
12	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 1,0µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	295	64
13	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	337	58
14	wie Gruppe 5	305	62
15	wie Gruppe 11	293	49
16	wie Gruppe 12	294	73

Tabelle 24

Versuch IV: CaBP

	Diät	x	± s
1	D-freie Kontrolle	2,09	0,7
2	D-freie Kontrolle + 100ppm Vit.C	2,79	0,6
3	8µg D ₃	6,91	1,5
4	8µg D ₃ + 100ppm Vit.C	6,69	1,2
5	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	3,03	0,7
6	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	3,57	0,8
7	2,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	7,44	1,4
8	0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	2,28	0,4
9	1,0µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	2,63	0,7
10	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 100ppm Vit.C	---	--
11	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	2,47	0,4
12	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 1,0µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	2,05	0,3
13	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	3,28	0,9
14	wie Gruppe 5	2,69	0,6
15	wie Gruppe 11	1,94	0,4
16	wie Gruppe 12	2,03	0,7

Tabelle 25

Versuch IV: Serumcalcium

	Diät	in mg/100ml	x	± s
1	D-freie Kontrolle		5,7	1,0
2	D-freie Kontrolle + 100ppm Vit.C		5,5	0,8
3	8µg D ₃		7,3	0,6
4	8µg D ₃ + 100ppm Vit.C		7,4	0,2
5	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃		6,3	0,8
6	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃		6,6	0,4
7	2,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃		7,4	0,7
8	0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃		6,2	0,8
9	1,0µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃		6,4	0,9
10	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 100ppm Vit.C		7,3	1,0
11	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃		7,6	1,2
12	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 1,0µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃		6,8	1,2
13	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃		6,6	0,9
14	wie Gruppe 5		6,6	1,2
15	wie Gruppe 11		6,4	1,2
16	wie Gruppe 12		7,2	1,4

Tabelle 26 Versuch IV: Absoluter und relativer Knochenaschegehalt

	Diät	g	%
1	D-freie Kontrolle	0,308	24,7
2	D-freie Kontrolle + 100ppm Vit.C	0,206	24,3
3	8µg D ₃	0,575	31,4
4	8µg D ₃ + 100ppm Vit.C	0,489	33,0
5	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,321	25,9
6	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,359	28,6
7	2,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,546	36,3
8	0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	0,273	23,9
9	1,0µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	0,310	25,4
10	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 100ppm Vit.C	0,344	26,8
11	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	0,360	26,8
12	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 1,0µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	0,342	27,4
13	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	0,445	30,4
14	wie Gruppe 5	0,346	26,5
15	wie Gruppe 11	0,335	26,6
16	wie Gruppe 12	0,342	27,0

Tabelle 27

Versuch IV: Alkalische Phosphatase

	Diät	U/l
1	D-freie Kontrolle	17.081
2	D-freie Kontrolle + 100ppm Vit.C	17.119
3	8µg D ₃	3.875
4	8µg D ₃ + 100ppm Vit.C	6.436
5	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	19.848
6	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	15.198
7	2,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	7.514
8	0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	12.805
9	1,0µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	14.423
10	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 100ppm Vit.C	17.186
11	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	17.287
12	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 1,0µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	13.749
13	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	4.481
14	wie Gruppe 5	14.423
15	wie Gruppe 11	13.513
16	wie Gruppe 12	12.367

4.5 Versuch V

In diesem Versuch wurde die Wirkung von Vitamin C in Kombination mit 16 µg Vitamin D₃ und in Kombinationen mit zwei Konzentrationen von 1,25(OH)₂D₃ (0,5 µg und 1,0 µg) untersucht. Außerdem wurden zwei Kombinationsgruppen mit dem synthetischen Analogon zu 1,25(OH)₂D₃, 1α(OH)D₃, gebildet. Nachdem im Versuch III die Dreierkombination von 0,5 µg 1,25(OH)₂D₃ mit 0,5 µg 1,24,25(OH)₃D₃ und 5,0 µg 24,25(OH)₂D₃ keine Wirkung gezeigt hatte, wurde in diesem Versuch die gleiche Kombination wiederholt.

1. Futterverzehr:

Den höchsten Futterverzehr zeigte die Gruppe mit 16 µg Vitamin D₃ + 100 ppm Vitamin C. Die Steigerung der Dosis von 1,25(OH)₂D₃ von 0,5 µg auf 1,0 µg erbrachte eine Steigerung des Futterverzehrs auf ca. 150 %.

Die Vitamin C supplementierten Gruppen wiesen einen höheren Futterverzehr auf als die jeweiligen Parallelgruppen ohne Vitamin C. Bei allen Kombinationen mit Vitamin D bzw. 1,25(OH)₂D₃ mit Vitamin C konnte eine synergistische Wirkung beobachtet werden. Auch die Dreierkombination und die Kombination 1 µg 1α(OH)D₃ mit 5,0 µg 24,25(OH)₂D₃ ließen einen synergistischen Effekt erkennen.

2. Gewichtszunahme:

Die höchsten Gewichtszunahmen erreichten die Gruppen mit 16 µg Vitamin D₃ in Kombination mit 100 ppm Vitamin C. Die Kombination 0,5 µg 1,25(OH)₂D₃ mit 5,0 µg 1,25,26(OH)₃D₃ erreichte einen Überadditiven Wert, wie schon in den vorangegangenen Versuchen (nicht signifikant). 0,5 µg 1,25(OH)₂D₃ und 1,0 µg 1,25(OH)₂D₃, jeweils mit 100 ppm Vitamin C-Zusatz, zeigten eine deutlich höhere

Gewichtszunahme als die jeweiligen Parallelgruppen ohne Vitamin C-Supplementierung.

3. CaBP:

Den höchsten CaBP-Wert erreichte die Gruppe mit 16 µg D₃ + 100 ppm Vitamin C. Der Wert lag deutlich über dem Vergleichswert ohne Vitamin C-Zusatz ($p = 0,05$). Die Gruppe 0,5 µg 1,25(OH)₂D₃ + 100 ppm Vitamin C ließ einen überadditiven Effekt erkennen (nicht signifikant), während die Gruppe 1 µg 1,25(OH)₂D₃ + 100 ppm Vitamin C weit unter dem Wert der negativen Kontrolle lag. Vermutlich lag ein Fehler in der Aufbereitung der Schleimhautproben zugrunde. Ebenfalls überadditive Wirkung zeigte die Gruppe 1,0 µg 1α(OH)D₃ mit 5,0 µg 24,25(OH)₂D₃ (nicht signifikant) und die Gruppe 0,5 µg 1,25(OH)₂D₃ mit 5 µg 1,25,26(OH)₃D₃ ($p = 0,001$). Die Dreierkombination zeigte nur unteradditive Wirkungen.

4. Serumcalcium:

Die höchsten Serumcalciumspiegel wurden bei der Gruppe mit 16 µg Vitamin D₃ gemessen, gefolgt von 16 µg Vitamin D₃ + 100 ppm Vitamin C. Ein überadditiver Effekt wurde bei der Kombination 0,5 µg 1,25(OH)₂D₃ mit 5,0 µg 1,25,26(OH)₃D₃ gemessen (nicht signifikant). 0,5 µg 1,25(OH)₂D₃ + 100 ppm Vitamin C zeigte die gleiche Wirkung wie 0,5 µg 1,25(OH)₂D₃ allein. Ein Synergismus war bei 1,0 µg 1α(OH)D₃ in Kombination mit 5,0 µg 24,25(OH)₂D₃ festzustellen (nicht signifikant).

5. Knochenasche, absolut und relativ:

Den höchsten absoluten Knochenascheanteil wies die Gruppe mit 16 µg D₃ auf, während prozentual die Gruppe mit 16 µg D₃

+ 100 ppm Vitamin C am höchsten lag. Hier war ein deutlicher Anstieg gegenüber der Vergleichsgruppe ohne Vitamin C zu beobachten. Bei beiden $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Gruppen (0,5 µg; 1,0 µg) zeigte sich mit Vitamin C-Zusatz eine Steigerung der Knochenasche gegenüber den Parallelgruppen ohne Vitamin C-Supplementierung.

Auch die Dreierkombination und beide Gruppen mit $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ zeigten überadditive Effekte auf die absolute Knochenasche. Die prozentuale Knochenasche zeigte in den Kombinationen mit 0,5 µg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ unteradditive Wirkungen. Dabei ist zu bemerken, daß bei fälschlicherweise zu hohem Knochenaschewert (Bestimmungsfehler, etc.) für 0,5 µg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ rein rechnerisch unteradditive Wirkungen gemessen werden, die nicht den tatsächlichen Wirkungen entsprechen. Der in diesem Versuch für 0,5 µg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gefundene Wert lag nicht auf der Dosis-Wirkungsgeraden, sondern darüber. Dagegen liegt der Wert der Parallelgruppe mit Vitamin C-Zusatz genau auf der Geraden. Würde man nun diesen Wert für die Berechnung der Kombinationseffekte einsetzen, so würde sich für die prozentuale Knochenasche jeweils eine additive Wirkung ergeben.

6. Alkalische Phosphatase:

Die Gruppen mit 16 µg D_3 mit und ohne Vitamin C-Zusatz erbrachten die stärksten Erniedrigungen der Alkalischen Phosphatase im Serum. 0,5 µg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ + 100 ppm Vitamin C zeigte eine stärkere Erniedrigung der Serumaktivität der AP als rein rechnerisch zu erwarten gewesen wäre. Durch die übrigen Kombinationen waren keine additiven oder gar synergistischen Effekte hinsichtlich der Senkung der Serumaktivität der Alkalischen Phosphatase zu erzielen.

Tabelle 29

Versuch V: Futterverzehr

	Diät	Futterverzehr g/Tier/Tag
1	D-freie Kontrolle	22,7
2	D-freie Kontrolle + 100ppm Vit.C	21,6
3	16µg D ₃	36,2
4	16µg D ₃ + 100ppm Vit.C	36,8
5	5,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	25,1
6	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 1,25,26(OH) ₃ D ₃	27,4
7	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	25,6
8	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 100ppm Vit.C	26,6
9	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	26,8
10	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 100ppm Vit.C	27,4
11	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃ + + 5,0µg 24,25(OH) ₃ D ₃	28,7
12	0,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	24,7
13	5,0µg 24,25(OH) ₃ D ₃	22,5
14	1,0µg 1α(OH)D ₃	27,0
15	1,0µg 1α(OH)D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	26,0
16	1,0µg 1α(OH)D ₃ + 5,0µg 24,25(OH) ₃ D ₃	28,9

Tabelle 29

Versuch V: Gewichtszunahme

	Diät	x	+ s
1	D-freie Kontrolle	181	37
2	D-freie Kontrolle + 100ppm Vit.C	204	60
3	16µg D ₃	413	80
4	16µg D ₃ + 100ppm Vit.C	384	56
5	5,0µg 1,25,26(OH) ₃ D ₃	222	38
6	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 1,25,26(OH) ₃ D ₃	297	50
7	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	249	67
8	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 100ppm Vit.C	292	36
9	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	275	63
10	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 100ppm Vit.C	293	60
11	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃ + + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	277	57
12	0,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	217	39
13	5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	205	67
14	1,0µg 1 ^α (OH)D ₃	313	80
15	1,0µg 1 ^α (OH)D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₃ D ₃	327	62
6	1,0µg 1 ^α (OH)D ₃ + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	289	84

Tabelle 30

Versuch U: CaBP

	Diät	x	+ s
1	D-freie Kontrolle	3,40	0,6
2	D-freie Kontrolle + 100ppm Vit.C	3,64	0,8
3	16µg D ₃	9,05	1,5
4	16µg D ₃ + 100ppm Vit.C	10,63	1,0
5	5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	3,39	0,8
6	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	4,60	0,7
7	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	3,59	0,5
8	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 100ppm Vit.C	3,90	1,0
9	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	4,09	1,0
10	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 100ppm Vit.C	3,08	0,5
11	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃ + + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	3,91	0,6
12	0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	3,92	0,8
13	5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	3,19	0,3
14	1,0µg 1α(OH)D ₃	4,27	1,0
15	1,0µg 1α(OH)D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	3,87	0,7
16	1,0µg 1α(OH)D ₃ + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	4,85	1,0

Tabelle 31

Versuch V: Serumcalcium

	Diät	mg/100ml	x	+ s
1	D-freie Kontrolle		6,0	1,0
2	D-freie Kontrolle + 100ppm Vit.C		6,2	0,5
3	16µg D ₃		8,8	0,7
4	16µg D ₃ + 100ppm Vit.C		8,3	1,0
5	5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃		6,3	1,1
6	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃		7,4	0,7
7	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃		6,9	0,7
8	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 100ppm Vit.C		6,8	0,5
9	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃		7,9	1,3
10	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 100ppm Vit.C		6,2	0,9
11	5,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃ + + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃		6,6	0,9
12	0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃		6,2	0,7
13	5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃		5,9	0,9
14	1,0µg 1α(OH)D ₃		5,6	0,8
15	1,0µg 1α(OH)D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃		5,9	0,8
16	1,0µg 1α(OH)D ₃ + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃		7,3	1,4

Tabelle 32 Versuch U: Absoluter und relativer Knochenaschegehalt

	Diät	g	%
1	D-freie Kontrolle	0,206	21,7
2	D-freie Kontrolle + 100ppm Vit.C	0,222	23,4
3	16µg D ₃	0,659	34,8
4	16µg D ₃ + 100ppm Vit.C	0,616	35,9
5	5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	0,275	24,4
6	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	0,369	27,8
7	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,312	27,5
8	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 100ppm Vit.C	0,342	25,2
9	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,379	28,3
10	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 100ppm Vit.C	0,392	28,1
11	5,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃ + + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	0,409	27,0
12	0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	0,227	22,6
13	5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	0,232	22,8
14	1,0µg 1α(OH)D ₃	0,309	26,5
15	1,0µg 1α(OH)D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	0,386	27,0
16	1,0µg 1α(OH)D ₃ + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	0,460	30,0

Tabelle 33

Versuch U: Alkalische Phosphatase

	Diät	U/l
1	D-freie Kontrolle	17.222
2	D-freie Kontrolle + 100ppm Vit.C	12.558
3	16µg D ₃	5.776
4	16µg D ₃ + 100ppm Vit.C	5.992
5	5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	13.060
6	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 5,0µg 1,25,26(OH) ₂ D ₃	14.352
7	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃	14.495
8	0,5µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 100ppm Vit.C	13.419
9	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃	12.271
10	1,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 100ppm Vit.C	16.469
11	5,0µg 1,25(OH) ₂ D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃ + + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	13.419
12	0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	12.701
13	5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	13.921
14	1,0µg 1α(OH)D ₃	14.460
15	1,0µg 1α(OH)D ₃ + 0,5µg 1,24,25(OH) ₂ D ₃	13.311
16	1,0µg 1α(OH)D ₃ + 5,0µg 24,25(OH) ₂ D ₃	10.584

5. Diskussion

Neben dem Vitamin D-Hauptmetaboliten $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ besitzen auch andere Metaboliten, wie zum Beispiel $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ biologische Wirksamkeit. Für die Kombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ waren synergistische Effekte berichtet worden. In den vorliegenden Untersuchungen sollte geklärt werden, ob dies auch mit $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ bzw. $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ möglich ist, bzw. ob vielleicht alle Kombinationen verabreichter Metaboliten einen synergistischen Effekt erzeugen können. Dabei ist unter Synergismus eine gegenseitige Wirkungsverstärkung verschiedener Vitamin D-Metaboliten zu verstehen.

Am empfindlichsten schien der Knochenaschegehalt auf verschiedene Konzentrationen von Vitamin D-Metaboliten zu reagieren. Als Hauptparameter diente deshalb die prozentuale Knochenasche, die den Mineralisationsgrad des Knochens unabhängig von seiner Größe angibt. Es zeigte sich, daß die Knochenasche am deutlichsten mit der Gewichtszunahme korreliert ist. Die Alkalische Phosphatase wies die größten Schwankungen auf und ist nicht geeignet, feine Unterschiede in der Vitamin D-Wirkung auf den Knochen widerzuspiegeln.

Bei Dosierungen in einem Bereich, in dem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ allein noch kaum Wirkung zeigt ($0,25 \mu\text{g}$), wird durch Kombination mit ebenfalls sehr niedrigen Dosen von $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($2,5 \mu\text{g}$ bzw. $5,0 \mu\text{g}$) gerade eben die Möglichkeit eines synergistischen Effektes auf die Knochenasche angedeutet. Wurde die Dosis von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf $0,5 \mu\text{g}$ erhöht, so zeigte sich in zwei Versuchen ein Synergismus bezüglich der Knochenasche, sowohl absolut als auch prozentual. In einem weiteren Versuch konnte lediglich eine Addition der Einzelwirkungen festgestellt werden, doch waren dort synergistische Effekte bei den Parametern Gewichtszunahme,

CaBP und Serumcalcium festzustellen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß die als letztes stattfindende Einlagerung von Calcium in den Knochen noch nicht so weit fortgeschritten war, wie es der Wirkung der Metaboliten entsprochen hätte. Diese Annahme wird dadurch gestützt, daß die Aktivität der Alkalischen Phosphatase bei dieser Gruppe gegenüber der Vitamin D-freien Kontrolle noch nicht zurückgegangen war.

Bei der Kombination von $0,5 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $15 \mu\text{g } 1,25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ konnte bei den Parametern Futterverzehr, Gewichtszunahme und absolute und relative Knochenasche kein Synergismus mehr auftreten, da bereits die gleichen Werte wie bei der positiven Kontrolle erreicht wurden, und somit keine weitere Steigerung möglich war. Ein Synergismus war jedoch bei den Parametern CaBP, Serumcalcium und Erniedrigung der Alkalischen Phosphatase vorhanden.

Der Metabolit $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurde nur in einem Versuch getestet. In den beiden eingesetzten Konzentrationen ($5,0 \mu\text{g}$ und $15,0 \mu\text{g}$) konnte $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ zusammen mit $0,5 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei keinem der Parameter eine synergistische Wirkung erzielen. Die Notwendigkeit einer Umwandlung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ zur Erlangung einer biologischen Wirksamkeit war in früheren Arbeiten bewiesen worden. Es scheint, daß dies auch für $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ Gültigkeit hat. Daß keine oder nur eine ungenügende Umwandlung stattgefunden hat, deutet auf eine mögliche geringe Affinität der 1α -Hydroxylase zu $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ hin.

Die Kombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($0,5 \mu\text{g}$) mit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($5,0 \mu\text{g}$) erbrachte einen synergistischen Effekt hinsichtlich der prozentualen Knochenasche. Bei der absoluten Knochenasche war die Wirkung lediglich additiv. Einen Hinweis darauf, daß dies durch die niedrige $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Dosierung verursacht sein könnte, geben zwei weitere

Versuche, bei denen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durch das synthetische Analogon $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ ersetzt worden war, aber die Dosis anstatt $0,5 \mu\text{g}$ auf $1,0 \mu\text{g}$ heraufgesetzt worden war. Dadurch konnten synergistische Effekte sowohl beim Knochenaschegewicht, als auch beim Mineralisationsgrad erzielt werden. Synergistische Effekte ergaben sich dann auch bei den Parametern Futterverzehr und CaBP.

Bei der Kombination der Metaboliten $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($0,5 \mu\text{g} + 0,5 \mu\text{g}$) konnte in einem Versuch lediglich ein additiver Wert für die absolute Knochenasche gemessen werden. Der Mineralisationsgrad war jedoch unteradditiv. Korrespondierend dazu zeigte sich ein hoher Serumcalciumspiegel und eine relative hohe Aktivität der Alkalischen Phosphatase. Dies deutet darauf hin, daß trotz hoher Calciumresorption im Darm, die Einlagerung von Calcium in den Knochen nicht mit dem Wachstum des Knochens Schritt halten konnte. In zwei weiteren Versuchen konnte dann ein eindeutiger Synergismus bei den Parametern prozentuale und absolute Knochenasche festgestellt werden. Auch bei einem Verhältnis 1:2 von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($0,5 \mu\text{g} + 1,0 \mu\text{g}$) zeigte sich der synergistische Effekt auf die Knochenasche.

Die Dreierkombination aus $0,5 \mu\text{g}$ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $0,5 \mu\text{g}$ $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und $5,0 \mu\text{g}$ $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ konnte in zwei Versuchen keine synergistischen Effekte erbringen, was umso erstaunlicher ist, als zwei Einzelkomponenten zusammen ($0,5 \mu\text{g}$ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3 + 0,5 \mu\text{g}$ $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$) eindeutige synergistische Wirkungen zeigten. Doch sind zwei Versuchsgruppen zu wenig, um eine entgültige Aussage zu treffen.

In zwei Versuchen, in denen Vitamin C eingesetzt wurde, konnte durch die Kombination von $0,5 \mu\text{g}$ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit 100 ppm Vitamin C ein synergistischer Effekt beim Knochenaschegewicht festgestellt werden. In einem Versuch verhielt sich auch die prozentuale Knochenasche

synergistisch, während im anderen Versuch nur ein unteradditiver Effekt zu erreichen war. Bei diesem Versuch wiesen auch Futterverzehr, Gewichtszunahme und CaBP sowie die Alkalische Phosphatase synergistische Wirkungen auf. Der genannte unteradditive Effekt läßt sich damit erklären, daß der Wert für den Parameter prozentuale Knochenasche bei der Einzelverabreichung von $0,5 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nicht wie zu erwarten, auf der Dosis-Wirkungsgeraden liegt, sondern darüber (Bestimmungsfehler, etc.). Würde man den auf der Gerade liegenden Wert berücksichtigen, so ergäbe sich ein zumindest additiver Effekt bei der prozentualen Knochenasche.

Bei Erhöhung der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Dosis von $0,5 \mu\text{g}$ auf $1,0 \mu\text{g}$ fanden sich ebenfalls synergistische Effekte in Kombination mit Vitamin C. Sogar bei der Gabe von $16 \mu\text{g}$ Vitamin D_3 pro kg Futter konnte durch 100 ppm Vitamin C-Zusatz noch eine Steigerung der Wirkung festgestellt werden. Durch diese hohe Dosis war zwar kein synergistischer Effekt auf das Knochenaschegewicht mehr festzustellen, doch konnte die gebildete Knochenmatrix stärker mineralisieren als ohne Vitamin C-Zusatz. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß durch Vitamin C-Supplementierung eine Steigerung der Knochenasche möglich ist, wegen der Funktion von Vitamin C bei der Kollagensynthese wird jedoch auch die Bildung von Knochenmatrix gesteigert, wodurch dann bei der prozentualen Knochenasche bei niedriger Metabolitendosierung keine synergistischen Effekte auftreten. Erst bei höherer Dosierung (z. B. $16 \mu\text{g } \text{D}_3$) wird bei der prozentualen Knochenasche ein Synergismus sichtbar.

Im letzten Versuch hatte sich gezeigt, daß durch Zugabe von 100 ppm Vitamin C zur Vitamin D-freien Kontrolle, zu $0,5 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, bzw. zu $1,0 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ein linearer Anstieg der Alkalischen Phosphatase zu verzeichnen war, was auf einen erhöhten Knochenstoffwechsel hindeutet. Dies würde im Einklang stehen mit einer Untersuchung von SUGIMOTO et

al. (1986), die durch Zugabe von Vitamin C zu Knochenzellkulturen einen linearen dosisabhängigen Anstieg der Alkalischen Phosphatase fanden. WEISER und SCHLACHTER (1986) berichten demgegenüber von einer Senkung der Alkalischen Phosphatase bei ihren Kombinationsversuchen mit Vitamin C.

Den Grund für den Synergismus zwischen Vitamin C und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sehen WEISER und SCHLACHTER (1986) nicht nur in einer optimalen Synthese der Knochenmatrix, sondern sie vermuten auch einen direkt stimulierenden Einfluß auf die 1 α -Hydroxylase.

Über die Ursache der beobachteten synergistischen Effekte bei Kombination verschiedener Vitamin D-Metaboliten, läßt sich beim gegenwärtigen Kenntnisstand nur spekulieren. Es sollten Hinweise erarbeitet werden, bei welchen Metaboliten-Kombinationen ein Synergismus bestehen könnte. Für das Zustandekommen der gegenseitigen Wirkungsverstärkung werden mehrere Theorien diskutiert. Eine Theorie geht davon aus, daß am intestinalen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Rezeptor des Kükens Bindungsstellen für $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vorhanden sind, die die Affinität des Rezeptors für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verändern (WILHELM and NORMAN, 1985). Es besteht auch die Möglichkeit, daß Vitamin D-Metaboliten die Anzahl der Rezeptoren für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ am Zielorgan beeinflussen. In vitro wurde dies in Nierenzellkulturen bei $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $25(\text{OH})\text{D}_3$ nachgewiesen (COSTA et al., 1985; SÖMJEN et al., 1986). Außerdem besteht die Möglichkeit, daß durch einen Vitamin D₃-Metaboliten die Metabolisierung des anderen verzögert wird, also eine längere Halbwertszeit mit entsprechender Wirkungsverstärkung die Folge ist. Für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ konnte dies nach Injektion von $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ nachgewiesen werden (HORST et al., 1983). Eine eventuelle Besetzung der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Rezeptorstellen durch die zugegeben Metaboliten bietet keine Erklärung für eine

Wirkungsverstärkung, da die eingesetzten Metaboliten durchweg weniger wirksam sind als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Auf den therapeutischen Nutzen einer kombinierten Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bzw. $1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurde bereits in früheren Arbeiten hingewiesen. Dabei wurde festgestellt, daß eine 1α -Hydroxylierung zur biologischen Wirksamkeit nötig ist (RAMBECK et al., 1986).

In der vorliegenden Arbeit konnten durch kombinierte Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ synergistische Wirkungen auf die Knochenasche gefunden werden. Dies gelang bei Kombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ nicht. Der steigernde Einfluß von Vitamin C auf die Knochenasche und andere Parameter lassen es sinnvoll erscheinen, auch in bestimmten Bereichen der Humanmedizin die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Therapie in Kombination mit Vitamin C zu versuchen.

6. Zusammenfassung

In fünf Fütterungsversuchen an rachitischen Hühnerküken wurde die antirachitische Aktivität von oral verabreichten Vitamin D-Metaboliten untersucht. Neben der Einzelverabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ wurden Kombinationen dieser Metaboliten mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ getestet. In zwei weiteren Versuchen wurde die Wirkung einer Vitamin C-Supplementierung untersucht.

Es zeigte sich, daß durch $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ in Kombination mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine überadditive Wirkungsverstärkung des einen Metaboliten durch den anderen (Synergismus) auf die absolute und prozentuale Knochenasche zu erzielen war. Der Synergismus war am stärksten ausgebildet, wenn $0,5 \mu\text{g}$ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit der 10-fachen Menge $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ kombiniert wurde. Bei Erhöhung der Dosis von $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ auf das 30-fache der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Menge ($0,5 \mu\text{g} + 15,0 \mu\text{g}$) wurde bereits die maximale Wirkung, wie mit $8 \mu\text{g}$ Vitamin D_3 , erreicht. Damit war eine eventuell auch bei dieser Kombination vorhandene synergistische Wirkung nicht mehr nachzuweisen.

Auch $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ zeigte in Kombinationen mit $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ synergistische Effekte. Bei der Kombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ konnte das Auftreten eines synergistischen Effekts nicht beobachtet werden. Ein überadditiver Wirkungsanstieg wurde ferner bei der absoluten und prozentualen Knochenasche durch Kombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, bzw. mit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ festgestellt.

Auch der Zusatz von Vitamin C verstärkt die antirachitische Wirkung von Vitamin D_3 bzw. von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. 100 ppm Vitamin C erhöhten sowohl das Knochenaschegewicht als auch den Futterverzehr, die Gewichtszunahme und das duodenale Calcium bindende Protein.

Wie der synergistische Effekt bei Kombination verschiedener Vitamin D-Metaboliten zustande kommt, bleibt ungeklärt. Es deutet sich jedoch an, daß die 1α -Hydroxylgruppe bei beiden Metaboliten vorhanden sein muß, bzw., daß ein Vitamin D-Metabolit ohne 1α -Hydroxylgruppe erst hydroxyliert werden muß, um einen synergistischen Wirkungsanstieg hervorzurufen.

Es scheint möglich, in den Bereichen der Humanmedizin, in denen bisher $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ allein eingesetzt wurde, die therapeutische Breite von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durch kombinierte Verabreichung mit $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ oder $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ zu erhöhen.

Summary

The effect of Vitamin D-metabolites and combinations of metabolites in prophylactic feeding experiments with rachitic chicks.

In five feeding assays in Vitamin D deficient chicks the antirachitic activity of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ as well as their combinations with each other was examined.

$1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ in combination with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ potentiated the $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induced effect on bone ash. The synergistic effect was strongest, when $0,5\mu\text{g}$ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ was combined with a tenfold quantity of $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$. When the dose of $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($0,5\mu\text{g} + 15\mu\text{g}$) the maximum effect as with 8μ Vitamin D_3 was attained. In this case, perhaps an existing synergism was not obvious.

$1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ no potentiation was attainable. A synergistic effect on bone ash was found too in combination of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ with $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ or $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. With Vitamin C supplementation (100 ppm) bone ash could be increased.

Bone ash per cent was increased by Vitamin C only with high Vitamin C doses. The parameters weight gain and duodenal Calcium Binding Protein were increased by Vitamin C supplementation as well.

The reason for the synergistic effects is unknown. It seems that both Vitamin D metabolites must possess the 1α -hydroxyl group or that a metabolite without 1α -hydroxyl group must be hydroxylated first to show a synergistic effect.

It seems possible that in fields of human medicine, where until now therapeutic effects were attained with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ alone, the combination of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ with $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ or $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ could be useful.

7. Literaturverzeichnis

AVIOLI, L.O., S.J. BIRGE, S.W. LEE (1968):

Effects of prednisone on vitamin D metabolism in man.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 28, 1341 - 1346

AVIOLI, L.O. (1984):

Calcium and Osteoporosis.

Ann. Rev. Nutr. 4, 471-491

ATKIN, J., J.C. PITA, A. ORNOY, A. AGUNDEZ, G. CASTIGLIONE, D.S. HOWELL (1985):

Effects of vitamin D metabolites on healing of low phosphate, vitamin D-deficient induced rickets in rats.

Bone 6, 113 - 123

BABARYKIN, D.A., V.K. BAUMAN, M.J. VALINIETSE, R.L. ROSENTHAL (1982):

Similarity and differences in $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ and $24,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ antirachitic effects.

In: Vitamin D, Chemical, Biochemical and Clinical Endocrinology of Calcium Metabolism.

Ed: A.W. Norman, K. Schäfer, D. von Herrath, H.-G. Grigoleit

Walter de Gruyter, Berlin/New York, 1201 - 1203

BAYLINK, D., G. HOWARD, J. IVEY, R. TURNER, J. FURLEY (1982)

Vitamin D and bone matrix formation and mineralisation.

Proc. Fifth Workshop on Vitamin D, Williamsburg, VA,

Abstract, 129 - 133

BELL, N.H., S. SHAW, R.T. TURNER (1984):

Evidence that 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits the hepatic production of 25-Hydroxyvitamin D₃ in man.

J. Clin. Invest. 74, 1540 - 1544

BELL, N.H. (1985):

Vitamin D-Endocrine System

J. Clin. Invest. 76, 1 - 6

BIKLE, D.D., B.P. HALLORAN, J.O. WHITNEY and B.W. Hollis (1984):

Measurement of 25,26-dihydroxyvitamin D: Importance of the configuration of the C-25 hydroxyl group Biochem. 23, 6920 - 6925

BIRGE, S.J. and J.G. HADDAD (1975):

25-hydroxycholecalciferol stimulation of muscle metabolism.

J. Clin. Invest. 56, 1100 - 1107

BISHOP, C.W., N.C. KENDRICK, H.F. DeLUCA (1983):

Induction of calcium-binding-protein before 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulation of duodenal calcium uptake.

J. Biol. Chem. 258, 1305 - 1310

BOUILLON, R., F.A. Van ASSCHE, H. Van BAELEN, W. HEYNS, P. DeMOOR (1981):

Influence of the vitamin D-binding protein on the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D₃

J. Clin. Invest. 67, 589 - 596

BOUILLON, R. and H. Van BAELEN (1981):

Transport of vitamin D: significance of free and total concentrations of vitamin D metabolites.

Calcif. Tissue Int. 33, 451 - 457

BOYLE, J.T., J.L. OMDAHL, R.W. GRAY, H.F. DeLUCA (1973):

The biological activity and metabolism of 24,25-dihydroxyvitamin D₃. J. Biol. Chem. 248, 4174 - 4180

BRANDI, M.L., A.D. CARTER, L.A. FITZPATRICK, K. SAKAGUCHI, S.J. MARX, G.D. AURBACH (1986):

1,25-dihydroxyvitamin D₃ suppresses function and replication of bovine cultured parathyroid cells.

IXth International Conference on calcium regulating hormones and bone metabolism.

October 25-November 1, 1986, Nizza, France

Abstract 33

BROMMAGE, R. and H.F. DeLUCA (1985):

Evidence that 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is the physiologically active metabolite of Vitamin D₃.

Endocrine Reviews 6, 491 - 511

CAPLAN, A.J., S. EDELSTEIN B.W. HOLLIS (1986):

Embryonic chick limb mesenchymal cells synthesize massive amounts of 24,25-dihydroxycholecalciferol which inhibit proteoglycan biosynthesis.

IXth International Conference on calcium regulating hormones and bone metabolism.

October 25-November 1, 1986, Nizza, France

Abstract 474

CHESNEY, R.W., R.B. MAZZES, A.J. HAMSTRA, H.F. DeLUCA, S. O'REGEAN (1978):

Reduction of serum 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in children receiving glucocorticoids.

Lancet 2, 1123 - 1125

CHRISTIANSEN (1983):

Chronic renal failure and vitamin D metabolites: a status report.

J. Steroid Biochem. 19, 517-523

CLEMENTS, M.R., L. JOHNSON , D.R. FRASER (1986):

Calcium deprivation induces metabolic inactivation of vitamin D.

IXth International Conference on calcium regulating hormones and bone metabolism.

October 25-November 1, 1986, Nizza, France

Abstract 37

COLETTE, C., L. MONNIER, F. BLOITMAN, P. BALDET , F. BONNEL (1986):

Effects of long term glucocorticoid treatments on calcium intestinal absorption and vitamin D metabolism.

IXth International Conference on calcium regulating hormones and bone metabolism.

October 25-November 1, 1986, Nizza, France

Abstract 388

CORRADINO, R.A., J.G. EBEL, P.H. CRAIG, A.N. TAYLOR, R.H. WASSERMAN (1971):

Calcium absorption and the vitamin D₃-dependent calcium-binding protein.

Calc. Tiss. Res. 7, 81-92

CORVOL, M.T., A. ULMANN, J. BOURGUIGNON, M. BRAMI, M.F. DUMONTIER, L. ISAGRIS (1985):

Cultured rabbit growth plate chondrocyte responsiveness to vitamin D metabolites related to cell maturation.

Sixth Workshop on Vitamin D

Merano, Italy; March 17 - 22

COSTA, E.M., M.A. HIRST, D. FELDMAN (1985):

Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors by vitamin D analogs in cultured mammalian cells.

Endocrin. 117, 2203 - 2210

DeLUCA, H.F. and J.G. GHAZARIAN (1980):

The role of vitamin D and its metabolites in calcium and phosphate metabolism.

In: Handbuch der Inneren Medizin VI/1A, Knochen, Gelenke, Muskeln.

Ed. F. Kuhlencordt, H. Bartelheimer

Springer Verlag, Berlin, 173 - 196

DeLUCA, H.F. (1981):

The biochemical basis of renal osteodystrophy and post-menopausal osteoporosis: a view from the vitamin D system.

Curr. Med. Res. Opin. 7, 279 - 293

DIETEL, M., A. NIENDORF, H. ARPS, G.U. CHILDS (1986):

Parathyroid hormone receptors (PTH-R) in tubulus cells of the kidney:

morphological localisation and determination of the distribution pattern.

IXth International Conference on calcium regulating hormones and bone metabolism.

October 25-November 1, 1986, Nizza, France

Abstract 126

DUNSTAN, C.R., E. HILLS, A.W. NORMAN, J.E. BISHOP, E. MAYER, S.Y.P. WONG (1985):

Treatment of hemodialysis bone disease with 24,25(OH)₂D₃ and 1,25(OH)₂D₃ alone or in combination.

Mineral Electelectolyte Metab. 11, 358-368

ENDO, H., M. KIYOKI, K. KAWASHIMA, I. NARUCHI Y. HASHIMOTO (1980):

Vitamin D₃ metabolites and PTH synergistically stimulate bone formation of chick embryonic femur in vitro.

Nature 286, 262-264

ESVELT, R.P., H.K. SCHNOES, H.F. DELUCA (1979)

Isolation and characterisation of 1 α -hydroxy-23-carboxytetranorvitamin D: a major metabolite of 1,25-dihydroxyvitamin D₃.

Biochem. 18, 3977-3983

FINE, N., I. BINDERMAN, D. SOMJEN, Y. EARON, S. EDELSTEIN, J. WEISMAN (1985):

Autoradiographic localization of 24R, 25-dihydroxy-vitamin D₃ in epiphyseal cartilage.

Bone 6, 99 - 104

FLURY, W. and B. HALDIMANN (1981):

Therapie mit Vitamin D und D-Metaboliten.

Schweiz. med. Wschr. 111, 314 - 321

FRASER, D.R. (1981):

Biochemical and clinical aspects of vitamin D function.

British Med. Bulletin 37, 37 - 42

FRIEDLANDER, E.J. and A.W. NORMAN (1975):

Production in vitro of 1,24,25 (OH)₂-Vitamin D₃ and search for its occurrence in vivo.

Arch. Biochem. Biophys. 170, 731 - 738

FRITSCH, J., C. SILVE, A. EDELMAN, T. ANAGNOSTOPOULOS,
S. BALSAN (1986):

In vitro induction by dexamethasone of membran
depolarization by parathormone (1-34) in human
osteoblast like (OB) cells.

IXth International Conference on calcium regulating
hormones and bone metabolism.

October 25-November 1, 1986, Nizza, France

Abstract 54

FUCIK, R.F.; S.C. KUKREJA, G.K. HARGIS, E.N. BOWSER,
W.J. HENDERSON, G.A. WILLIAMS (1975):

Effects of glucocorticoids on function of the
parathyroid glands in man.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 40, 152-155

FULLMER, C.S., M.E. BRINDAK, S. EDELSTEIN, R.H.
WASSERMAN (1984):

Early and direkt effect of 1,25-dihydroxycholecalciferol
on calcium-uptake by duodena of rachitic chicks.

Soc. Exp. Biol. Med. 177, 455 -458

GARABEDIAN, M., M.F. HOLLICK, H.F. DeLUCA, J.T. BOYLE
(1972):

Control of 25-dihydroxycholecalciferol metabolism by
parathyroid glands.

Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 167 -1676

GARABEDIAN, M., Y. TANAKA, M.F. HOLICK, DeLUCA (1974):

Response of intestinal calcium transport on bone calcium
mobilization to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in
thyreoparathyroidectomized rats.

Endocrin., 94, 1022 - 1027

GARABEDIAN, M., M. LIEBERHERR, T.M. N'GUYEN, M.T. CORVOL, M.B. DUBOIS, S. BALSAN (1978):

In vitro production and activity of 24,25-dihydroxycholecalciferol in cartilage and calvarium.

Clin. Orthop. Rel. Res. 135, 241 - 248

GERTNER, J.M., R.L. HORST, A.E. BROADUS (1979):

Parathyroid hormone function and vitamin D metabolism during human growth hormone replacement.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 49, 185 - 189

GIULIANI, D.L. and R.L. BOLAND (1984):

Effects of vitamin D₃ metabolites on calcium fluxes in intact chicken skeletal muscle and myoblasts cultured in vitro.

Calcif. Tissue Int. 36, 200 -205

GOWEN, N., D.D. WOOD, E.J. IHRJE, M.K.B. MCGUIRE, R.G.G. RUSSELL (1983):

An interleukin 1 like factor stimulates bone resorption in vitro.

Nature 306, 378 - 384

GRAY, T.K., G.E. LESTER, R.S. LORENC (1979):

Evidence for extra-renal 1 α -hydroxy-vitamin D₃ in pregnancy.

Science 204, 1311 - 1313

GRAY, R.W. (1981):

Control of plasma 1,25 (OH)₂-vitamin D₃ concentrations by calcium and phosphorus in the rat: effects of hypophysectomie.

Calcif. Tissue Int. 33, 485 - 488

GRAY, R.W., T.L. GORTHWAITE, L.S. PHILLIPS (1983):
Growth hormone and triiodothyronine permit an increase
in plasma $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ concentrations in response to
dietary phosphate deprivation in hypophysectomized rats.
Calcif. Tissue Int. 35, 100 - 106

GREER, F.R. and R.C. TSANG (1983):
Vitamin D in human milk: is there enough?
J. Pediatric Gastroenterology and Nutrition 2, 277-281

HADDAD, J.G. and J. WALGATE (1976):
Radioimmunoassay of binding protein for vitamin D and
its metabolites in human serum: concentration in normal
subjects and patients with disorders of mineral
homeostasis.
J. Clin. Invest. 58, 1217 - 1222

HAINING, S.A., T. CUNDY, D.F. GUILLAND-CUMMING, J.
BUTLER, J.A. KANIS (1986):
Parathyroid hormone independent increase in $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$
production during lactation: a prolactin mediated effect
on the 1α -hydroxylase in man?
IXth International Conference on calcium regulating
hormones and bone metabolism.
October 25-November 1, 1986, Nizza, France
Abstract 19

HALLORAN, B.P., E.N. BARTHELL, H.F. DeLUCA (1979):
Vitamin D metabolism during pregnancy and lactation in
the rat.
Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 5543 - 5549

HAY, A.W.M., A.G. HASSAM, M.A. CRAWFORD, P.A. STEVENS,
E.B. MAWER, F. SUTHERLAND-JONES (1980):

Essential fatty acid restriction inhibits vitamin D-
dependent calcium absorption.

Lipids 15, 251 - 254

HENRY, H.L., A.N. TAYLOR, A.W. NORMAN (1977):

Response of chick parathyreoid glands to the vitamin D
metabolites 1,25-dihydroxycholecalciferol and 24,25-
dihydroxycholecalciferol.

J. Nutrition 107, 1918 - 1926

HENRY, H. (1979)

Regulation of the hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃
in vivo and in primary cultures of chick kidney cells.

J. Biol. Chem. 254, 2722 - 2729

HENRY, H.L. (1981)

25 (OH) D₃-metabolism in kidney cell cultures: lack of a
direct effect of estradiol.

Am. J. Physiol. 240, 119 - 124

HENRY, H.L. and A.W. NORMAN (1984):

Vitamin D metabolism and biological actions.

Ann. Rev. Nutr. 4, 493-520

HENRY, H. (1986):

Evidence for a role for protein kinase C activation in
the regulation of 25 (OH) D₃ metabolism.

IXth International Conference on calcium regulating
hormones and bone metabolism.

October 25-November 1, 1986, Nizza, France

Abstract 76

HODLER, B., U. EVEQUOZ, U. TRECHSEL, H. FLEISCH, B. STADLER (1985):

Influence of vitamin D₃ metabolites on the production of interleukin 1,2 and 3

Immunbiol. 170, 256 - 269

HOLICK, M.F., A. KLEINER-BOSSALLER, H.K. SCHNOES, P.M. KASTEN, J.T. BOYLE, H.F. DeLUCA (1973):

1,24,25-Trihydroxyvitamin D₃ - a metabolite of vitamin D₃ effective on intestine.

J. Biol. Chem. 10, 6691 - 6696

HOLICK, M.F., J.A. MacLAUGHLIN, M.B. CLARK, S.A. HOLICK, J.T. POTTS, Jr., R.R. ANDERSON, J.H. BLANK, J.A. PARRISH, P. ELIAS (1980):

Photosynthesis of previtamin D₃ in human skin and the physiologic consequences.

Science 210, 203 - 205

HOLICK, M.F. (1983):

The photobiology of vitamin D and its consequences for humans.

Ann. New York Acad. Sci. 8, 2-13

HOLTROP, M.E., C.A. COX, M.B. CLARK, M.F. HOLICK, C.S. ANAST (1981):

1,25-dihydroxycholecalciferol stimulates osteoclasts in rat bones in the absence of parathyroid hormone.

Endocrin. 108, 2293 - 2299

HORNIG and FRIGG (1979):

Effect of age on biosynthesis of ascorbate in chicks.

Arch. Geflügelk. 43, 108 - 112

HORST, R.L., K. HOVE, E.T. LITTLEDIKE, T.A. REINHARDT, M.R. USKOVIC, J.J. PARTRIDGE (1983):

Plasma concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, 1,24 R,25-trihydroxyvitamin D₃ and 1,25,26-trihydroxyvitamin D₃ after their administration to dairy cows.

J. Dairy Sci. 66, 1455 - 1460

HORTON, J.E., J.J. OPPENHEIM, S.E. MERGENHAGEN, L.G. RAISZ (1974):

Macrophage-lymphocyte synergy in the production of osteoclast activating factor.

J. Immunol. 113, 1278 - 1284

IKEKAWA, N., N. KOIZUMI, E. OSHIMA, S. JSHIZUKA, T. TAKESHITA, Y. IANAKA, H.F. DeLUCA (1983):

Natural 25,26-dihydroxyvitamin D₃ is an epimeric mixture.

Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 5286 - 5288

ISHIZUKA, S., T. TAKESHITA, A.W. NORMAN (1984):

Naturally occurring 24,25-dihydroxyvitamin D₃ is a mixture of both C-24 R and C-24 S epimers.

Arch. Biochem. Biophys. 234, 97 - 104

JARNAGIN, K., S.-Y. ZENG, M. PHELPS, H.F. DeLUCA (1985):

Metabolism and pharmacokinetics of 24,25-dihydroxyvitamin D₃ in the vitamin D₃-replete rat.

J. Biol. Chem. 260, 13 625 - 13 630

KADOWAKI, S. and A.W. NORMAN (1985):

Demonstration that the vitamin D metabolite 1,25 (OH)₂-vitamin D₃ and not 24 R, 25 (OH)₂-vitamin D₃ is essential for normal insulin secretion in the perfused rat pancreas.

Diabetes 34, 315 - 320

KANIS; J.A.; D. GUILLAND-CUMMING; A.D. PATERSON, R.G.G.
RUSSELL (1982):

The role of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in calcium homeostasis.

In: Vitamin D: Chemical, biochemical, and clinical endocrinology of calcium metabolism.

Ed: A.W. Norman, K. Schäfer, D. von Herrat, H.-G. Grigoleit

Walter de Gruyter, Berlin/New York, 157-167

KHANDEKAR, K.N., D.M. DUBEWAR, S.A. SURYAWANSHI (1986):
Role of gonadal steroids in regulation of plasma and bone electrolytes in the lizard, *calotes versicolor* (DAUDIN)

IXth International Conference on calcium regulating hormones and bone metabolism.

October 25-November 1, 1986, Nizza, France

Abstract 347

KIDRONI, G., R. HAR-NIR, J. MENCZEL, J.W. FRUTKOFF, Z. PALTI, M. RON (1983):

Vitamin D metabolites in rat epididymis: high $24,25$ -dihydroxyvitamin D_3 levels in the cauda region.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 113, 982 - 989

KNUTSON, J.C. and H.F. DeLUCA (1974):

25 -Hydroxyvitamin D_3 - 24 -hydroxylase: subcellular location and properties.

Biochem. 13, 1543 - 1548

KOBAYASHI, N., J. RUSSEL, D. LETTIERI and L.M. SHERWOOD
(1986):

The potential role of protein kinase C activation in the
stimulation of parathyroid hormone secretion by low
calcium.

IXth International Conference on calcium regulating
hormones and bone metabolism.

October 25-November 1, 1986, Nizza, France

Abstract 25

KRUSE, H.P. (1985):

Behandlung mit Vitamin D, D-Hormonen und synthetischen
Analogon.

Dtsch. med. Wschr., 110, 66-70

KUMAR, R., D. HARNDEN, H.F. DeLUCA (1978):

Rat intestinal 25-hydroxyvitamin D₃ and 1 α ,25-
dihydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase.

J. Biol. Chem. 253, 3804 - 3809

LARKINS, G.R., S.J. MacAULEY, A. RAPOPORT, I.J. MARTIN,
B.R. TULLOCK (1974):

Effects of nucleotides, hormones, ions and 1,25-
dihydroxycholecalciferol on 1,25-dihydroxycholecalci-
ferol production in isolated chick renal tubules.

Clin. Sci. Mol. Med. 46, 569 - 582

LAWSON, D.E.M. (1984):

Rickets and osteomalacia.

Proc. Nutr. Soc. 43, 249 - 256

LIAN, J.B., L. COHEN-SOLAL, D. KOSSIVA, M.J. GLIMCHER (1982):

Changes in phosphoprotein of chicken bone matrix in vitamin D-deficient rickets.

FEBS Lett. 149, 123-131

LUCAS, P.A., B. LACOUR, T. DRUECKE (1986):

Rapid in vitro stimulation of Ca^{2+} influx into isolated rat enterocytes by $1,25(OH)_2D_3$: possible role of alteration in polyamine metabolism.

IXth International Conference on calcium regulating hormones and bone metabolism.

October 25-November 1, 1986, Nizza, France

Abstract 75

LUND, J. and H.F. DeLUCA (1966):

Biologically active metabolite of vitamin D_3 from bone, liver, and blood serum.

J. Lipid Res. 7, 739-744

MALLUCHE, H.H., C. MATTHEWS, M.C. FAUGERE, P. FANTII, R.M. FRIEDLER (1986):

$1,25(OH)_2$ -vitamin D_3 maintains activity of bone cells and parathyroid hormone modulates number of bone cells in dogs with renal failure.

IXth International Conference on calcium regulating hormones and bone metabolism.

October 25-November 1, 1986, Nizza, France

Abstract 377

MATSUMOTO, T., N. HORIUCHI, T. SUDA, H. TAKAHASHI, E. SHIMAZAWA, E. OGATA (1979):

Failure to demonstrate stimulatory effect of prolactin on vitamin D metabolism in vitamin D deficient rats.

Metabolism 28, 925 - 927

MATSUMOTO, T., Y. KAWANOBE and E. OGATA (1985):

Regulation of 24,25 dihydroxyvitamin D₃ and synthetic human parathyroid hormone fragment 1-34 in a cloned monkey kidney cell line (ITC -12)

Biochim. Biophys. Acta 845, 358-365

MAWER, E.B., (1983):

Functional control over the metabolic activation of calciferol.

In: Endocrinology of calcium metabolism. Ed. J.A. Parson
Raven Press, New York, 271 - 295

McCOLLUM, E.U., N. SIMONDS, J.E. BECKER et al. (1922):

Studies on experimental rickets. XXI. An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition.

J. Biol. Chem. 53, 293-312

NABAITZ, R., W.E. STUMPF, M. SAR (1981):

The role of autoradiographic and immunocytochemical technic in the clarification of sites of metabolism and action of vitamin D.

J. Histochem. Cytochem. 29, 91 - 98

NABAITZ, R., W.E. STUMPF, M. SAR, S. HUANG, H.F. DeLUCA (1983):

Autoradiographic localization of target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in bones from fetal rats.

Calcif. Tissue Int. 35, 177 - 183

NAGUBANDI, S., J.M. LONDOWSKY, S. BOLLMANN; P. TIETZ, R. KUMAR (1981):

Synthesis and biological activity of vitamin D-3 β -sulfate.

J. Biol. Chem. 256, 5536-5539

NEMERE, J. and A.W. NORMAN (1986):

1,25 (OH)₂ D₃ stimulated vesicular transport of calcium in chick duodenum: lysosomes and endocytic vesicles. IXth International Conference on calcium regulating hormones and bone metabolism.

October 25-November 1, 1986, Nizza, France

Abstract 366

NOFF, D., D. GOODWIN, S. EDELSTEIN (1978):

Metabolism and tissue distribution of 24,25-dihydroxycholecalciferol in the presence of 1-hydroxylcalciferol.

J. Mol. Med. 3, 147 - 155

NORMAN, A.W., (1968):

The mode of action of vitamin D.

Biol. Rev. 43, 97 - 137

NORMAN, A.W., K.L. HENRY, H. MALLUCHE (1980):

24,25-dihydroxyvitamin D₃ and 1 α -dihydroxyvitamin D₃ are both indispensable for calcium and phosphorus homeostasis.

Life Sciences 27, 229 - 237

NORMAN, A.W., 1984

Hormonal actions of vitamin D.

Curr. Topics in Cell. Regul. 24, 35 - 49

NOWICKI, H.G., R.G. WONG, J.F. MYRTLE, A.W. NORMAN (1972):

Inhibition of biological activity of cholecalciferol (vitamin D₃) by o,p'-DDT or p,p'-DDT in rachitic cockerel.

J. Agric. Food Chem. 20, 376 - 380

ORNOY, A., D. GOODWIN, D. NOFF, S. EDELSTEIN (1978):
24,25-dihydroxyvitamin D is a metabolite of vitamin D
essential for bone formation.

Nature 276, 517 - 519.

PARTRIDGE, J.J., S.I. SHIUEY, N.K. CHADHA, E.G.
BAGGIOLINI, P.N. CONFALONE, J. KULESHA, P. WDWKULICH,
M.R. USKOVIC, R. BARMER (1981):

Synthesis and structure proof of a vitamin D metabolite,
25 S, 26-dihydroxycholecalciferol.

In: Osteoporosis: Recent advances in pathogenesis and
treatment.

Ed.: H.F. DeLuca, H.M. Frost, W.S.S. Log, C.C. Johnston,
A.M. Parfitt

University Park Press, Baltimore, 487 - 498

PAULSON, S.K. and A.D. KENNY (1985):

Effect of dietary mineral and vitamin D content and
parathyroidectomy on the plasma disappearance rate of
1,25-dihydroxyvitamin D₃ in rats.

Biopharm. and Drug Disposition 6, 359 - 372

PIKE, J.W., J.B. PARKER, M.R. HAUSSLER, A. BOASS, S.U.
TOWERND (1979):

Dynamic changes in circulating 1,25-dihydroxyvitamin D₃
during reproduction in rats.

Science 204, 1427 - 1429

PÜCK, G. und H. JUAN (1985):

Allgemeine Pharmakodynamik

Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York, 72-74

PROUVEDINI, D.M., C.D. TSOUKAS, L.J. DEFTOS, S.C. MANOLAGOS (1983):

1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in human leukocytes. Science 221, 1181 - 1183

PUSCHETT, J.B., P.C. FERNANDEZ, J.T. BOYLE, R.W. GRAY, J.L. OMDAHL, H.F. DeLUCA (1972 b):

The acute renal tubular effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 141, 379 - 384

RASMUSSEN, H., M. WONG, D. BIKLE, D.B.P. GOODMAN (1972): Hormonal control of the renal conversion of 25-hydroxycholecalciferol to 1,25-dihydroxycholecalciferol. J. Clin. Invest. 51, 2502 - 2504

RASMUSSEN, H., T. MATSUMOTO, O. FONTAINE, D.B.P. GOODMAN (1982):

Role of changes in membrane lipid structure in the action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃.

Fed. Proc. 41, 72 - 77

RAMBECK, W.A. and H. ZUCKER (1985):

Synergistic effects of 1,25(OH)₂D₃ and 24,25(OH)₂D₃ on duodenal CaBP in rachitic chicks and on eggshell weight in Japanese quails.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 126, 799-804

RAMBECK, W.A., H. WEISER, W. MEIER and H. ZUCKER (1986):

1,24,25(OH)₃D₃ increases the bioactivity of 1,25(OH)₂D₃. IXth International Conference on calcium regulating hormones and bone metabolism.

October 25-November 1, 1986, Nizza, France

Abstract 405

REDDY, G.S., G. JONES, S.W. KOOH, D. FRASER, H.F. DeLUCA (1983):

Stimulation of 24R, 25-dihydroxyvitamin D₃ synthesis by metabolites of vitamin D₃.

Am. Physiol. Soc. E, 359-364

REINHARDT, I.A., J.L. NAPOLI, B. PRAMANIH, E.T. LITTLEDIKE, D.C. BEITZ, J.J. PATRIDGE, M.R. USKOVIC, R.L. HORST (1981):

1 α ,25,26-trihydroxyvitamin D₃: an in vivo and in vitro metabolite of vitamin D₃.

Biochem. 20, 6230 - 6235

REINHARDT, I.A., J.L. NAPOLI, D.C. BEITZ, E.T. LITTLEDIKE, R.L. HORST (1981):

A new in vivo metabolite of vitamin D₃: 1,25,26-trihydroxyvitamin D₃.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 99, 302 - 307

RICKERS, H., C. CHRISTIANSEN, P. CHRISTENSEN, M. CHRISTENSEN, P. ROBRO (1985):

Serum concentrations of vitamin D metabolites in different degrees of impaired renal function.

Nephron 39, 267 - 271

SCHMIDT-GAYK, H. E. MAYER, R. GARTNER, W. TSCHOPE, J. MERKE (1981):

Klinische Bedeutung der Bestimmung von Vitamin D und D-Metaboliten bei renaler Osteopathie.

Nieren und Hochdruckkrankheiten Jahrgang 10 (4) 148-153

SHERWOOD, L.M., J. RUSSEL, L. CANTLEY, D. LETTIERI (1986):

The effects of calcium and $1,25 \text{ (OH)}_2 \text{ D}_3$ on the synthesis and secretion of parathyroid hormone.

IXth International Conference on calcium regulating hormones and bone metabolism.

October 25-November 1, 1986, Nizza, France

Abstract 735

SINGH, R., C.J. JOYNER, M.J. PEDDIE, T.G. TAYLOR (1986):

Changes in the concentrations of parathyroid hormone and ionic calcium in the plasma of laying hens during the egg cycle in relation to dietary deficiencies of calcium and vitamin D.

Gen. Compar. Endocrin. 61, 20 - 28

SOMJEN, D., Y. WEISMAN, E. BERGER, A. HARELL, A.M. KAYE, I. BINDERMAN (1986):

The role of $24,25 \text{ (OH)}_2 \text{ D}_3$ in the maturation of rat kidney.

Endocrin. 118, 354-359

SPANOS, E., K.W. COLSTON, I.M.A. EVANS (1976):

Effect of prolactin on vitamin D metabolism.

Mol. Cell. Endocrin. 5, 163 - 169

SPENCER, R., M. CHARMAN, D.E.M. LAWSON (1978):

Stimulation of intestinale calcium-binding-protein mRNA synthesis in the nucleus of vitamin D-deficient chicks by $1,25$ -dihydroxycholecalciferol.

Biochem. J. 175, 1089 - 1094

STUNZI, H. und E. WEISS (1982):

Allgemeine Pathologie Paul Parey Verlag, Berlin, 7. Auflage, S. 226

SUDA, T. (1986):

Cellular mechanisms of bone resorption induced by 1,25-dihydroxyvitamin D₃.

IXth International Conference on calcium regulating hormones and bone metabolism.

October 25-November 1, 1986, Nizza, France

Abstract 56

SUDA, T., H.F. DeLUCA, H.K. SCHNOES, Y. TANAKA, M.F. HOLLICK (1970):

24,25-dihydroxycholecalciferol: of metabolite of vitamin D₃ preferentially active on bone.

Biochem. 9, 4776 - 4780

SUGIMOTO, T., M. NAKADA, M. FUKASE, Y. IMAJ, Y. KINOSHITA, T. FUJITA (1986):

Effects of ascorbic acid on alkaline phosphatase activity and hormone responsiveness in the osteoblastic osteosarcoma cell line UMR-106.

Calcif. Tissue Int. 39, 171 - 174

SUTTON, R.A.L. and J.H. DIRKS (1978):

Renal handling of calcium.

Fed. Proc. 37, 2112 - 2119

TAFT, J.L. and R.G. LARKINS (1986):

A role for the cytoskeleton in renal vitamin D metabolism.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 134, 218 - 226

TANAKA, Y. and H.F. DeLUCA (1973):

Stimulation of 24,25-dihydroxyvitamin D₃ production by 1,25-dihydroxyvitamin D₃.

Science 183, 1198 - 1200

TANAKA, Y., H.F. DeLUCA, N. IKEKAWA, M. MORISAKI, N. KOIZUMI (1975):

Determination of stereochemical configuration of 24-hydroxyl groups of 24,25-dihydroxyvitamin D₃ and its biological importance.

Arch. Biochem. Biophys. 170, 620 - 626

TANAKA, Y., L. CASTILLO and H.F. DeLUCA (1977):

The 24-hydroxylation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃.

J. Biol. Chem. 252, 1421 - 1424

TANAKA, Y., L. CASTILLO, M.J. WINELAND, H.F. DeLUCA (1978):

Synergistic effect of progesterone, testosterone and estradiol in the stimulation of chick renal 25-hydroxyvitamin D₃-1-hydroxylase.

Endocrin. 103, 2035 - 2039

TANAKA, Y., H.K. SCHNOES, C.M. SMITH, H.F. DeLUCA (1981):

1,25,26-trihydroxyvitamin D₃: isolation identification and biological activity.

Arch. Biochem. Biophys. 210, 104 - 109

TANAKA, Y., E. ABE, C. MIYAURA, I. KURIBAYASAKI, K. KONNO, Y. NISHU, I. SUDA (1982):

1,25 (OH)₂ D₃ and a human myeloid leukemia cell line (HL-60): the presence of a cytosol receptor and induction of differentiation.

Biochem. J. 204, 713 - 719

TETI, A. and A.Z. ZALLONE (1986):

A working hypothesis: Ca^{++} concentration controls directly osteoclast activity.

IXth International Conference on calcium regulating hormones and bone metabolism.

October 25-November 1, 1986, Nizza, France

Abstract 55

THOMASSET, M., J. REDEL, P. MARCHE, P. CUISINIER-GLEIZES (1979):

$25(R),26$ and $25(S),26(OH)_2D_3$: biological activity in intact and nephrectomized rats. Comparative effects of $1,25,24(R)(OH)_2D_3$ and $1,24(R),25(OH)_2D_3$.

In: Vitamin D, Basic Research and its Clinical Application.

1979 Walter de Gruyter und Co., Berlin, New York

THOMASSET, M., C.O. PARKES, P. CUISINIER-GLEIZES (1982):

Rat calcium-binding-protein: distribution, development and vitamin D dependence.

Am. Physiol. Soc. E. 483-488

TINKLER, S.M.B., D.M. WILLIAMS, N.W. JOHNSON (1981):

Osteoclast formation in response to intraperitoneal injection of 1-hydroxycholecalciferol in mice.

J. Anat. 133, 91-103

TRECHSEL, U., J.-P. BONJOUR, H. FLEISCH (1979):

Regulation of the metabolism of 25-hydroxyvitamin D_3 in primary cultures of chick kidney cells.

J. Clin. Invest. 64, 206 - 217

TURNER, R.T., J.E. PUZAS, M. FORTE, G.E. LESTER, T.K. GRAY, G.A. HOWARD, D.J. BAYLINK (1980):

In vitro synthesis of 1,25-dihydroxycholecalciferol and 24,25-dihydroxycholecalciferol by isolated calvarial cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 5720 - 5724

UNDERWOOD, J. and H.F. DeLUCA (1984):

Vitamin D is not directly necessary for bone growth and mineralization.

Am. J. Physiol. E, 493 - 498

WALD, H., T. HAYEK, M. POPOVITZER (1985):

24,25 (OH)₂ D₃ enhances the calcemic effect of 1,25 (OH)₂ D₃.

Proc. Soc. Experim. Biol. Med. 180, 219 - 223

WALLING, M.W., D.L. HARTENBOWER, J.W. COBURN, A.W. NORMAN (1977):

Effects of 1 α ,25-, 24 R,25- and 1 α , 24 R,25-hydroxylated metabolites of Vitamin D₃ on calcium and phosphate absorption by duodenum from intact and nephrectomized rats.

Arch. Biochem. Biophys. 182, 251 - 257

WALTERS, M.R., W. HUNZIKER, A.W. NORMAN (1980):

Unoccupied 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors. Nucleus/cytosol ratio depends on ionic strength.

J. Biol. Chem. 255, 6799 - 6805

WALTERS, M.R., W. HUNZIKER, A.W. NORMAN (1981):

Apparent nuclear localization of unoccupied receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D₃.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 98, 990 - 996

WASSERMAN, R.H., R.A. CORRADINO, A.N. TAYLOR (1968):
Vitamin D-dependent calcium-binding-protein. Purification and some properties.
J. Biol. Chem. 243, 3978 - 3986

WASSERMAN, R.H., M.E. BRINDAK, S.A. MEYER, C.S. FULLMER (1982):
Evidence for multiple effects of vitamin D₃ on calcium absorption: response of rachitic chicks, with or without partial vitamin D₃ repletion, to 1,25-dihydroxyvitamin D₃.
Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 7939 - 7934

WASSERMAN, R.H. AND C.S. FULLMER (1983):
Calcium transportprotein, calcium absorption and vitamin D.
Ann. Rev. Physiol. 45, 375 - 390

WEISMAN, Y., A. VARGAS, G. DUCKETT, E. REITER, A. ROOT (1978):
Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D in the nephrectomized pregnant rat.
Endocrin. 103, 1992 - 1998

WEISER, H. und M. SCHLACHTER (1986):
Die kombinierte Anwendung von Vitamin D₃, Vitamin D₃-Metaboliten und Vitamin C.
Deutsche Gesellschaft für Osteologie, Abstracts
2. Tagung vom 24-27. Sept. 1986, Berlin

WILHELM, F. and A.W. NORMAN (1985):
24 R,25-dihydroxyvitamin D₃ regulates 1,25-dihydroxyvitamin D₃ binding to its chick intestinal receptor.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 126, 496 - 501

WINDAUS, A., F. SCHENCK, F. WERDER (1936):

Über das antirachitisch wirksame Bestrahlungsprodukt aus
7-dehydro-cholesterin.

Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 241, 100-103

WONG, G.L., R.A. LUBEN, D.U. COHN (1977):

1,25-dihydroxycholecalciferol and parathormone: effects
on isolated osteoclast-like and osteoblast-like cells.

Science 197, 663 - 671

Herrn Professor Dr. H. Zucker danke ich für die Überlassung des Themas.

Mein Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Dr. med. vet. habil. W.A. Rambeck für seinen Rat bei der Planung und Durchführung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt allen, die mich bei der Durchführung der Arbeit tatkräftig unterstützt haben, allen voran Frau Wetzel und Frau Bachhuber, sowie den Kolleginnen und Kollegen S. Meier, B. Schäfer, S. Geldner, G. Geyer., M. Wierich und B. Wicklein.

Frau Maria Völk möchte ich neben ihrer selbstlosen Unterstützung meiner Arbeit vor allem für die interessanten Gespräche beim Futtermischen danken.

Mein Dank gilt ferner dem Tierpflegepersonal der Abteilung Oberwiesenfeld für die allzeit gern gewährte Hilfe.

Lebenslauf

Josef Benedikt Mohn

25.07.1957	in Tettnang geboren Vater : Josef Mohn, Landwirt Mutter: Mathilde Mohn, geb. Ehrhardt
1967-1973	Besuch der Realschule Bodnegg
1973-1976	Wirtschaftsgymnasium Ravensburg
1976-1978	Wehrdienst
1978-1980	LKW-Fahrer mangels Studienplatz
WS80 - WS85	Studium der Tiermedizin an der LMU-München
14.08.1981	Verehelichung mit Frä. Sigrid Bürgy
18.07.1984	Geburt unseres Sohnes Tobias
21.11.1985	Abschluß des Staatsexamens
17.03.1986	Approbation als Tierarzt
Dez. 1985	Beginn der Arbeit an der vorliegenden Dissertation
April-Sept. 1986	Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie, Physiolo- gische Chemie und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig- Maximilians-Universität München
19.03.1987	Geburt unserer Tochter Christina Larissa

